THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Microbiologie et Biocatalyse industrielles*

Présentée et soutenue par

Gwénaëlle JARD

Le 3 décembre 2009

Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation

---

JURY

Sevastianos ROUSSOS, Directeur de recherches IRD Marseille, Rapporteur
Sabine GALINDO, Professeur, Polytech' Montpellier, Rapporteur
Florence FORGET, Directeur de recherches, INRA Bordeaux
Isabelle OSWALD, Directeur de recherches, INRA Toulouse
Alain GUYONVARC'H, Responsable R&D Evialis, Vannes
Thierry LIBOZ, Maître de conférences ENSAT
Ahmed LEBRIHI, Professeur et Directeur de l'ENSAT

Ecole doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries (*SEVAB)*
Unité de recherche : *Laboratoire de Génie Chimique (UMR n°5503), Toulouse*
Directeurs de thèse : *Thierry LIBOZ, Ahmed LEBRIHI*

« Dans un domaine de recherche en pleine expansion comme la biologie, on constate que toute avancée des connaissances génère autant d'interrogations qu'elle apporte de réponses. »

Pierre Joliot

Avant-propos

Le travail présenté dans le document suivant a été réalisé au sein du « Laboratoire de Génie Chimique » (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS) dans le département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » à l' « Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse ». Il a été financé par « Evialis », une compagnie spécialisée dans la fabrication et la commercialisation d'aliments pour animaux, de prémix ou mélanges d'additifs et de produits de santé et d'hygiène pour les animaux. Une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) a été menée pendant 3 ans. Ce travail a donné lieu à deux publications, une publiée et une acceptée (cf Annexe I et II).

Remerciements

Ecrire les remerciements… Ce n'est finalement pas la partie la plus facile à rédiger. J'ai d'ailleurs repoussé leur écriture jusqu'à la toute fin de peur de ne pas trouver les mots justes. Je m'y attèle cependant maintenant que le pavé est terminé.

Tout d'abord, je tiens à remercier Sevastianos ROUSSOS, directeur de recherche à l'IRD de Marseille, Sabine GALINDO, professeur à l'université de Montpellier pour avoir évalué ce travail en tant que rapporteurs. Je voudrais également remercier Isabelle OSWALD, directrice de recherche de l'INRA de Toulouse et Florence FORGET-RICHARD, directrice de recherche à l'INRA de Bordeaux pour avoir accepté de participer au jury de thèse. Un grand merci à Marcel DELAFORGE, directeur de recherche au CEA de Saclay qui m'a énormément aidé par ses conseils avisés et son aide au moment crucial de la détermination du composé de transformation. Il m'a ainsi permis de rebondir après une petite « série noire ». Je tiens à remercier Pierre GALTIER pour son implication dans le projet, notamment par sa présence aux comités de pilotage tout au long de ma thèse. Il nous a fait part de son expérience pour mieux orienter le travail à chaque étape. Je tiens aussi à remercier très chaleureusement Alain GUYONVARC'H, responsable R et D d'Evialis pour son implication sans faille au projet et pour sa réactivité dans les moments critiques. Vous m'avez permis de présenter mes travaux dans de nombreux congrès et je vous en suis très reconnaissante. Pour finir, merci aux deux derniers membres du jury, et non les moindres, mes encadrants de thèse, Thierry LIBOZ, maître de conférences au Laboratoire de Génie Chimique et Ahmed LEBRIHI, professeur et directeur de l'ENSAT. Merci Thierry pour ton implication au quotidien et surtout pour avoir corrigé le pavé sous la chaleur de l'été. Merci Ahmed pour les conseils scientifiques avisés. Merci également à Florence MATHIEU, professeur et responsable de l'équipe pour son aide.

Merci à tous pour la confiance que vous m'avez accordée.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Benoît VAN DER REST et David ROUZINEAU pour leur bonne humeur et leurs bons conseils en matière d'enseignements, bouffée d'air frais durant la thèse. J'ai beaucoup apprécié votre compagnie ainsi que celles des étudiants de l'ENSAT.

Je vais maintenant passer à ceux qui ont participé de près ou de loin à mon travail de recherche mais qui ont toujours été présents au laboratoire. Un énorme merci à Patricia NOUVET alias « Pat », la petite maman de tous les thésards

passant par là, toujours prête à rendre service. Que serait le labo sans toi ? Merci pour ton implication dans l'organisation du travail, pour tes conseils (et pas que scientifiques n'est-ce pas…) et ta disponibilité à toute épreuve. Je garderai en mémoire tous ces moments de convivialité passés ensemble. Merci à Marie-Carmen MONJE, maître de conférences dans l'équipe qui a su faire régner la bonne humeur tout en travaillant. Merci pour ta disponibilité, ta serviabilité et ton dynamisme MCM.

Merci également aux stagiaires que j'ai martyrisés pendant ma thèse à savoir Florent BRUNAUD et Jessica BOUAFIA, sans qui j'aurais du élaguer tout un pan de ma recherche. Allez, vous avez survécus ! En tout cas, ce fut un plaisir pour moi de vous bichonner. Merci à vous d'avoir amené du sang neuf et de nous avoir bien fait rigoler.

Un grand merci à Anne-Claire CHORIN, ma compagne de labo pendant 3 ans (et de bien avant, ça ne nous rajeunit pas dis donc !). Merci pour ton aide au quotidien et pour nos discussions interminables sur la thèse and co. Une petite pensée à nos amis respectifs, obligés d'entendre parler d'HPLC, de spores et de Saccharotrix sans pouvoir en placer une. Merci également à Muriel THULLIER qui a également joué un grand rôle au début de ma thèse. Merci pour ton amitié et ta bonne humeur à toute épreuve.

Je tiens à remercier les personnes présentes au laboratoire durant ces 3 ans. D'abord, merci aux anciens, Ali ATOUI et André EL KHOURY qui nous ont passé la main pour voguer vers la recherche libanaise. Merci à Nafees BACHA, doctorant de la même fournée 2009. Merci de nous avoir fait découvrir la nourriture pakistanaise avec Hussnein SIDDIQUE. Merci à Caroline STRUB pour les discussions sur l'avenir et à Rafik ERRAKI… Merci à la belle brochette de stagiaires : Céline, Nesrine, Diana, Aurélie, Florence, Samia, Slim, Rim, Hella, Amina … Merci à la bande algérienne Riba, Abdelghani, Farida, Rabiaa, Attika et j'en oublie, pour les pauses cafés agrémentées de gâteaux tous meilleurs les uns que les autres. Je voudrais également souhaiter une bonne retraite à notre Gérard VIGNAU national ! Merci également aux autres membres du laboratoire, José RAYNAL, Annie LEZSKOWICZ…
Merci aux « filles d'en face », Marianna POZLAVNU, Kheira HADJEBA et Virginie FAUCET pour votre aide en culture cellulaire et en dépannage divers. Merci aux thèsards et autres d'Ecolab (Bertrand, Geff, Timothée, Gaëlle, Laure, Sylvain, Sophie…) pour les pique-niques en été et les bonnes rigolades dans le couloir. Merci également à Jérôme SYLVESTRE et Georges MERLINA pour les dépannages de

tout ordre (odeur, matériel...). Même si je n'ai pas eu beaucoup le temps de faire connaissance, je souhaite bonne route à Philippe et Stéphane au sein du labo. Comme vous le voyez la liste est longue mais pas exhaustive. Je suis sûre d'en oublier certains. Merci également à Gérard SURAN, toujours prêt à rende service.

Pour qu'une thèse se passe bien, il faut savoir décompresser. Merci donc à mes amis pour les parties de rigolade et pour votre intérêt pour ce truc bizarre qui est la thèse.

Je voudrais enfin remercier du fond du cœur ma famille et en particulier mes parents, Christine et Claude, pour m'avoir toujours soutenue et pour m'avoir portée jusque là. Merci notamment de m'avoir chouchoutée pendant ma rédaction. Merci à mes sœurs, Anne-Laure et Florence, toutes tristes de ne pas voir leurs noms en gras dans les remerciements dans la version provisoire. Allez, ça y est vous y êtes et vous le méritez bien !! Pour finir, un énorme merci à Olivier pour m'avoir soutenue et motivée et ce surtout dans la dernière ligne droite.

Abréviations

Abréviation	Signification
AA	Solution antibiotique
ACN	Acétonitrile
AFB1, B2, G1, G2, M1	Aflatoxine B1, B2, G1, G2, M1
AFM1	Aflatoxine M1
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire Alimentaire
ALARA	As Low As Reasonably Acheavable
ANOVA	Analysis of Variance
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AP1	Amino-polyol FB1
ATCC	American Type Culture Collection
Aw	Activité de l'eau
BATH	Bacterial Adherence Test Hydrophobicity
BSA	Bovine Serum Albumine
CAST	Council for Agricultural Science and Technology
CCM	Chromatographie Couche Mince
CEA	Centre d'Energie Atomique
CIRIMAT	Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux
CPG	Chromatographie Phase Gazeuse
CO_2	Dioxyde de carbone
CYA	Czapeck Yeast Agar
DAS	Diacetoxyscirpenol
DJT	Dose Journalière Tolérable
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DON	Déoxynivalénol
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EIC	Extraction Ion Current
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMAN	European Mycotoxin Awareness Network
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
ESI	Electrospray Inisation
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FB1, FB2, FB3, FB4	Fumonisine B1, B2, B3, B4
FDA	Food and Drug Administration
FX	Fusarénone X
GLU	Glutamine
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSCAS	Aluminosilicates de sodium calcium hydratés
IARC	International Agency for Research on Cancer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7
MS	Spectrométrie de masse
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NIV	Nivalénol
O_2	Dioxygène
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
OP1	Amino-polyol FB1 oxydé

Abréviation	Signification
OPA	O-Phthaldialdehyde
OTA, OTB, OTC, α	Ochratoxine A, B, C, α
PAT	Patuline
PBS	Phosphate Buffer Saline
P_{95}	95ème percentile
UE	Union Européenne
SVF	Sérum de veau fétal
SVF-TC	Sérum de veau fétal traité au charbon
TIC	Total Ion Current
UFC	Unité formant colonies
UI	Unité Internationale : correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'1µmol de substrat par minute
USA	United States of America
XPS	X ray photoelectron spectroscopy
ZEA	Zéaralénone

Liste de publications et communications

PUBLICATIONS

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. Adsorption of zearalenone by *Aspergillus japonic*us conidia: new trends for biological ZON decontamination in animal feed. *World Mycotoxin Journal*, **2**, 391-397.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., André, F., Delaforge, M., Lebrihi, A. Transformation of zearalenone to zearalenone sulfate by *Aspergillus sp*. (accepted in *World Mycotoxin Journal*).

PRESENTATIONS ORALES

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. Mise au point d'un procédé biologique de transformation de la zéaralénone dans les aliments pour bétail. Journée de la recherche ENSAT. 26 juin 2008, ENSAT, Castanet-Tolosan.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. Adsorption de mycotoxines présentes dans les aliments pour bétail par des spores de moisissures. Journée de l'école doctorale SEVAB. 21 novembre 2008, INRA, Castanet-Tolosan.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. Etudes de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales : Adsorption et Biotransformation. Séminaire Biosym. 12 novembre 2009, Laboratoire de Génie Chimique, Labège.

PRESENTATION DE POSTERS

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. Adsorption of zearalenone by *Aspergillus japonic*us conidia: new trends for biological ZON decontamination in animal feed. The World Mycotoxin Forum the fifth, 17-18 novembre 2008. Noordwijk, Pays-Bas.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., Lebrihi, A. Adsorption of different mycotoxins by *Aspergillus japonic*us conidia: new trends for biological decontamination in animal feed. ISM 2009, 9-11 septembre 2009. Tulln, Autriche.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A., André, F., Delaforge, M., Lebrihi, A. Transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate by *Aspergillus sp*., ISM 2009, 9-11 septembre 2009. Tulln, Autriche.

Liste des tableaux et figures

Tableau 1: Tableau recapitulatif de la toxicite de differentes mycotoxines (a partir d'AFSSA, 2009).....9
Tableau 2 : Mycotoxines et moisissures productrices associees (AFSSA, 2009).....16
Tableau 3 : Temperatures caracteristiques de croissance de quelques *Aspergilli*, *Penicillia* et *Fusarium*.....17
Tableau 4: Principaux champignons, mycotoxines et denrees associees (donnees regroupees a partir d'AFSSA, 2009).....18
Tableau 5 : Estimation des apports alimentaires des forts consommateurs (P95) pour la population generale (adultes) et des doses journalieres tolerables en differentes mycotoxines (AFSSA, 2009).....19
Tableau 6 : Teneurs maximales autorisees dans les aliments pour betail en Europe en 2006 (d'apres la Recommandation de la commission du 17 aout 2006).....20
Tableau 7 : Quantite maximale autorisee dans les denrees alimentaires destinees a l'homme en Europe en 2006 (d'apres le reglement CE n°1881/2006).....20
Tableau 8 : Adsorption de differentes mycotoxines par du charbon active.....25
Tableau 9 : Adsorption de differentes mycotoxines par des phyllosilicates.....26
Tableau 10 : Adsorption de differentes mycotoxines par des HSCAS.....27
Tableau 11 : Adsorption de differentes mycotoxines par des zeolithes.....27
Tableau 12 : Adsorption de differentes mycotoxines par des polymeres.....28
Tableau 13 : Adsorption de differentes mycotoxines par des levures ou produits derives de levure.....29
Tableau 14 : Adsorption de differentes mycotoxines par des bacteries lactiques.....30
Tableau 15 : Efficacite des differentes categories d'adsorbants selon les mycotoxines.....31
Tableau 16 : Transformation de l'AFB1 par differents microorganismes.....34
Tableau 17 : Transformation de l'OTA par differents microorganismes.....36
Tableau 18 : Transformation de la ZEA par differents microorganismes.....37
Tableau 19 : Structures chimiques de differents metabolites de la ZEA.....39
Tableau 20 : Transformation du deoxynivalenol par differents microorganismes.....40
Tableau 21 : Structures chimiques de differents metabolites du DON.....41
Tableau 22: Transformation de la toxine T-2 par differents microorganismes.....41
Tableau 23 : Structures chimiques de differents metabolites de la toxine T-2 ou HT-2.....42
Tableau 24: Transformation de la FB1 par differents microorganismes.....43
Tableau 25 : Structures chimiques de differents metabolites de la FB1.....43
Tableau 26 : Souches fongiques et bacteriennes utilisees.....50
Tableau 27 : Differents adsorbants utilises et leurs fournisseurs associes.....50
Tableau 28 : Programmes et chaines HPLC utilisees pendant l'etude.....52
Tableau 29 : Gradient utilise pour l'analyse de la ZEA, methode longue.....52
Tableau 30 : Conditions d'adsorption en fonction des differents essais effectues.....54
Tableau 31 : Niveau de contamination du maïs utilise.....56
Tableau 32 : Conditions d'adsorption en fonction des differents essais effectues.....61
Tableau 33 : Pourcentage de ZEA dosee dans les echantillons (filtrat, lavage, extrait) par rapport a la quantite de ZEA soluble et insoluble dosee dans les temoins.....77
Tableau 34 : Parametres d'adsorption calcule par le modele de Hill pour l'adsorption de la ZEA et des spores inactivees de Mu541 (10^7 spores /mL) a pH 2,5 et a pH 6.....79
Tableau 35 : Quantite de ZEA contenue dans le maïs naturellement contamine par la ZEA, traite par ajout de spores Mu541 inactivees a raison de 1g ou 100 mg pour 25g de maïs.....80
Tableau 36 : Adsorption de la ZEA par les spores inactivees Mu541 dans un milieu complexe.....81
Tableau 37 : Ratio atomique des elements trouves dans le spectre ESCA par rapport au carbone total.....86
Tableau 38 : Ratio atomique des differents carbones par rapport au carbone.....87
Tableau 39 : Ratio atomique des differents oxygenes par rapport au carbone.....87
Tableau 40 : Ratios atomiques pour les constituants modeles de la surface des spores (extrait de Gerin *et al.*, 1993).....87
Tableau 41 : Mesures d'hydrophobicite de la surface des spores par BATH test et mesure d'angle de contact.....88
Tableau 42 : Hydrophobicite des adsorbants commerciaux.....89
Tableau 43 : Caracteristiques de surface des spores inactivees a la chaleur, inactivees a l'acide chlorhyrique et pour differents traitements de surface utilises et efficacite d'adsorption associee.....89
Tableau 44 : Pourcentage d'elimination de la ZEA par les cellules entieres, le milieu extracellulaire, le mycelium inactive a la chaleur et le mycelium en croissance d'*A. niger* CA936.....97
Tableau 45 : Concentration en proteines intracellulaires et elimination de la ZEA par l'extrait brut en fonction de 3 temps de broyage.....98
Tableau 46 : Differents essais effectues pour essayer d'optimiser le tampon d'extraction du milieu intracellulaire*.....99
Tableau 47 : Activite specifique (µmol de ZEA eliminee/g de proteines) obtenue pour differentes fractions proteiques intracellulaires.....100

FIGURE 1 : STRUCTURES CHIMIQUES DES AFLATOXINES B1, B2, G1 ET G2. 6
FIGURE 2 : STRUCTURES CHIMIQUES DES OCHRATOXINES (A, B ET C DU HAUT VERS LE BAS). 6
FIGURE 3 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA ZEARALENONE. 7
FIGURE 4 : STRUCTURES CHIMIQUES DES TRICHOTHECENES. 7
FIGURE 5 : STRUCTURES CHIMIQUES DES FUMONISINES. 7
FIGURE 6 : VOIE GENERALE DE METABOLISATION ET D'EXCRETION DE XENOBIOTIQUES (D'APRES PUSSA, 2007). 8
FIGURE 7 : PRINCIPALES VOIES DE DISTRIBUTION, D'ABSORPTION ET D'EXCRETION DES MOLECULES TOXIQUES (D'APRES PUSSA, 2007). 9
FIGURE 8 : METABOLISME DE L'AFLATOXINE B1 DANS LE FOIE (D'APRES YIANNIKOURIS ET JOUANY, 2002). 10
FIGURE 9 : METABOLISME DE L'OTA DANS LE FOIE (D'APRES PFOHL-LESZKOWICZ, 1999). 11
FIGURE 10 : CONFORMATIONS DE LA ZEARALENONE ET D'ESTROGENE NATUREL (EXTRAIT DE GAUMY *ET AL.*, 2001). 11
FIGURE 11 : STRUCTURES CHIMIQUES DE LA ZEARALENONE ET DE SES DERIVES TELS QUE LES A-ZEARALENOL, B-ZEARALENOL, ZEARALANONE, A-ZEARALANOL, B-ZEARALANOL (EXTRAIT DE SHAUT *ET AL.*, 2008) 12
FIGURE 12 : METABOLISME DE LA BIOSYNTHESE DES BASES SPHINGOÏDES. 13
FIGURE 13 : PRINCIPES D'ANALYSE DES MYCOTOXINES (EXTRAIT DE DRAGACCI *ET AL.*, 2005). 14
FIGURE 14: DIFFERENTS ORGANISMES IMPLIQUES DANS LA LEGISLATION DE RESIDUS. 20
FIGURE 15 : DIAGRAMME DE CONSERVATION DES CEREALES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE L'HUMIDITE (D'APRES BURGES ET BURREL, 1964). P.G : POUVOIR GERMINATIF. 23
FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'ALUMINOSILICATES : LES ZEOLITHES (A) ET LES BENTONITES (B) 25
FIGURE 17 : DIAGRAMME DES DIFFERENTES ETAPES NECESSAIRES A UNE VALIDATION D'UN ADSORBANT. 32
FIGURE 18 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'AFD1. 33
FIGURE 19 : REACTION CHIMIQUE DE DEAMINATION DE LA FB1. 33
FIGURE 20 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'AFB1 AVEC SON CYLCLE LACTONE ET SON CYCLE DIFURANE. 35
FIGURE 21 : DEGRADATION DE L'OTA EN PHENYLALANINE ET OTα. 35
FIGURE 22 : DIAGRAMME DES DIFFERENTES ETAPES NECESSAIRES A UNE VALIDATION D'UN PROCEDE BIOLOGIQUE DE DECONTAMINATION. 44
FIGURE 23: REACTION DE DERIVATISATION DE LA FB1 PAR L'OPA. 51
FIGURE 24 : DIFFERENTES ETAPES ET PARAMETRES ASSOCIES POUR LES TESTS D'ADSORPTION DES MYCOTOXINES. 53
FIGURE 25 : PROTOCOLE UTILISE POUR MIMER L'ADSORPTION DANS DES CONDITIONS DE PH, DE TEMPERATURE ET DE TEMPS DE SEJOUR D'UN SYSTEME DIGESTIF DE PORC, INSPIRE DE DÖLL *ET AL.*, 2004. 55
FIGURE 26: REPRESENTATION GRAPHIQUE DES CONSTANTES D'AFFINITE DETERMINEE AVEC LE MODELE DE HILL. 56
FIGURE 27 : BOMBARDEMENT D'UN ATOME PAR DES RAYONS X. 58
FIGURE 28 : SPECTRE D'ENERGIE DE LIAISON DES ELECTRONS LIES AU CARBONE A L'AZOTE ET A L'OXYGENE. 58
FIGURE 29: SPECTRE D'ENERGIE DE LIAISON DES ELECTRONS LIES AU CARBONE. LA COURBE NOIRE EST LE SPECTRE OBTENU EXPERIMENTALEMENT. LES COURBES ROUGES CORRESPONDENT AUX VALEURS CALCULEES CORRESPONDANT A DES CARBONES LIES AU CARBONE OU A DES OXYGENES. LA COURBE PROCHE DE LA COURBE EXPERIMENTALE EST LA SOMME DES COURBES 59
FIGURE 30 : FORME D'UNE GOUTTE D'EAU SUR UNE SURFACE HYDROPHOBE (A.) ET SUR UNE SURFACE HYDROPHILE (B.). 59
FIGURE 31 : DIFFERENTES ETAPES ETUDIEES DANS LA DETOXICATION DE LA ZEA. 60
FIGURE 32 : DIFFERENTES ETAPES ET PARAMETRES ASSOCIES POUR LES TESTS DE DETOXICATION DE LA ZEA PAR DU MYCELIUM EN CROISSANCE. 61
FIGURE 33 : AMPLIFICATION DES CELLULES MCF-7. 64
FIGURE 34 : TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE. 65
FIGURE 35 : TRANSFORMATION DU MTS EN FORMAZAN. 66
FIGURE 36 : DIFFERENTES ETAPES DE LA STRATEGIE D'ETUDE DES SPORES COMME ADSORBANTS DE MYCOTOXINES. 71
FIGURE 37 : DIFFERENTES ETAPES DE LA STRATEGIE D'ETUDE DE LA DETOXICATION DE LA ZEA. 72
FIGURE 38 : ELIMINATION DE LA ZEA PAR DES SPORES VIVANTES ET INACTIVEES DE 5 ISOLATS D'*ASPERGILLUS* DE LA SECTION NIGRI (3 *A.JAPONICUS* : AX35 , CA223, MU541 ET 2 *A. NIGER*: GX312, MUX44). L'ELIMINATION A ETE OBSERVEE JUSTE APRES CONTACT OU APRES 60 MINUTES. 74
FIGURE 39 : INFLUENCE DES DIFFERENTES CONDITIONS D'INACTIVATION SUR L'EFFICACITE DES SPORES A ADSORBER LA ZEA. 75
FIGURE 40 : DISTRIBUTION DE LA ZEA LORS DES DIFFERENTES ETAPES DU PROCEDE D'EXTRACTION (ZEA DANS LE FILTRAT,ZEA DANS L'EAU DE LAVAGE, ZEA DANS L'EXTRAIT METHANOLIQUE, ZEA NON DOSEE) POUR LES TEMOINS NEGATIFS (ZEA SANS SPORES). 76
FIGURE 41: DISTRIBUTION DE LA ZEA LORS DES DIFFERENTES ETAPES DU PROCEDE D'EXTRACTION (ZEA DANS LE FILTRAT, ZEA DANS L'EAU DE LAVAGE , ZEA DANS L'EXTRAIT METHANOLIQUE, ZEA NON DOSEE). 77
FIGURE 42 : ADSORPTION DE LA ZEA PAR DES SPORES VIVANTES ET INACTIVEES DE L'ISOLAT D'*A. JAPONICUS* MU541 POUR PLUSIEURS CONCENTRATIONS EN SPORES (10^6; 10^7; 10^8; 2.10^8 SPORES/ML) DANS UN TAMPON PHOSPHATE-CITRATE (0,05M, PH 6) CONTAMINE PAR 1 µG/ML DE ZEA. 78
FIGURE 43 : ADSORPTION DE LA ZEA PAR DES SPORES NACTIVEES DE L'ISOLAT D'*A. JAPONICUS* MU541 A DIFFERENTS PH (DE PH 2 A PH 11) POUR UNE CONCENTRATION EN SPORES DE 10^7 SPORES/ML DANS UN TAMPON PHOSPHATE-CITRATE OU BORATE (0,05M) CONTAMINE PAR 1 µG/ML DE ZEA. 78
FIGURE 44 : CONCENTRATION EN ZEA ADSORBEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ZEA INITIALE A PH 2,5 ET A PH 6 79
FIGURE 45 : ADSORPTION DE LA ZEA PAR DES SPORES NACTIVEES DE L'ISOLAT D'*A. JAPONICUS* MU541 DANS UN MIME DE SYSTEME DIGESTIF POUR UNE CONCENTRATION EN SPORES DE 10^7 SPORES/ML DANS DU TAMPON PHOSPHATE-CITRATE (0,05M) CONTAMINE PAR 1 µG/ML DE ZEA. 80
FIGURE 46 : POURCENTAGE D'ELIMINATION DES MYCOTOXINES OTA, ZEA ET FB1 PAR DES SPORES INACTIVEES D'*A. JAPONICUS* MU541 (10^7 SPORES/ML) DANS DU TAMPON PHOSPHATE-CITRATE (0,05M). L'ADSORPTION A ETE EFFECTUEE A PH 2,5 (A, C) ET PH 6 (B, D). LES MYCOTOXINES ONT ETE PLACEES DANS LE TAMPON SOIENT SEULES (A, B) SOIT EN MELANGE (C, D). 82
FIGURE 47 : POURCENTAGE D'ELIMINATION DE LA ZEA PAR DIFFERENTS ADSORBANTS COMMERCIAUX (CHARBON ACTIF CARBOVET®, ZEOLITHE A, MTB-100®, SPORES INACTIVEE MU541) DANS DU TAMPON PHOSPHATE-CITRATE (0,05M). L'ADSORPTION A ETE EFFECTUEE A PH 2,5 (A) ET PH 6 (B). 83
FIGURE 48 : POURCENTAGE D'ELIMINATION DE L'OTA PAR DIFFERENTS ADSORBANTS COMMERCIAUX (CHARBON ACTIF CARBOVET®, ZEOLITHE A, MTB-100®, SPORES INACTIVEE MU541) DANS DU TAMPON PHOSPHATE-CITRATE (0,05M). L'ADSORPTION A ETE EFFECTUEE A PH 2,5 (A) ET PH 6 (B). 83

FIGURE 49 : PHOTOGRAPHIE DE SPORES D'*A. JAPONICUS* MU541 INACTIVEES A LA CHALEUR, GROSSIES AU MICROSCOPE A BALAYAGE ELECTRONIQUE (A. X7000, B. X50000). 86
FIGURE 50 : COMPOSITION DE SURFACE (% MASSIQUE) ESTIMEE A PARTIR DE L'ANALYSE ESCA ET SELON LE MODELE ETABLI PAR GERIN *ET AL.*, 1993. EN GRIS SONT REPRESENTES LES LIPIDES, EN BLANC LES GLUCANES ET EN RAYE LES PROTEINES. 88
FIGURE 51 : ANGLE DE CONTACT OBTENU PAR UNE GOUTTE D'EAU SUR UNE SURFACE REMPLIE DE SPORES. 88
FIGURE 52 : POTENTIEL ZETA DE LA SURFACE DES SPORES POUR DIFFERENTS PH (TAMPON PHOSPHATE-CITRATE, 0,05M) 89
FIGURE 53 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA MELANINE. 90
FIGURE 54 : STRUCTURES CHIMIQUES ET PKA DES 3 MYCOTOXINES ETUDIEES (A. OTA, B. ZEA, C. FB1), DE L'UREE ET DU SDS. 91
FIGURE 55 : FORMES IONIQUES DES GROUPEMENTS IONISABLES DE L'OTA, LA ZEA ET LA FB1. 91
FIGURE 56 : CRIBLAGE DE SOUCHES (A. *ASPERGILLUS* DE LA SECTION NIGRI, B. *STREPTOMYCES*) EN CROISSANCE SUR LEUR CAPACITE A ELIMINER LA ZEA DU MILIEU DE CULTURE. 95
FIGURE 57 : CONCENTRATION EN ZEA EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION (A.) ET CINETIQUE D'ELIMINATION DE LA ZEA (µG/ML) PAR L'ISOLAT D'*A. NIGER* CA936 EN CROISSANCE SUR DU MILIEU CONTAMINE PAR DE LA ZEA A 1 µG/ML (-) ET VITESSE D'ELIMINATION DE LA ZEA (+) (B.). 96
FIGURE 58 : CINETIQUE D'ELIMINATION DE LA ZEA SUR 12 JOURS PAR L'ISOLAT D'*A. NIGER* CA936 EN CROISSANCE SUR DU MILIEU CONTAMINE PAR DE LA ZEA A 1 µG/ML. 96
FIGURE 59 : ACTIVITE TOTALE (µMOL DE ZEA ELIMINEE/L) (HISTOGRAMME BLEU) ET CONCENTRATION EN PROTEINES (G/L) (LIGNE ROUGE) DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS ETUDIEES. LES FRACTIONS PROTEIQUES ONT ETE OBTENUES APRES FRACTIONNEMENT AU SULFATE D'AMMONIUM (0-40%-60%-80%) 100
FIGURE 60: SPECTRE UV DES CULTURES DE L'ISOLAT *A. NIGER* CA936 EN MILIEU MINERAL 101
FIGURE 61 : CONCENTRATION DE LA ZEA A DIFFERENTS TEMPS D'INCUBATION DE LA SOUCHE D'*A. NIGER* CA936 EN CROISSANCE SUR DU MILIEU CONTAMINE PAR DE LA ZEA DES CONCENTRATIONS DE 5 µG/ML , 10 µG/ML , 50 µG/ML , 100 µG/ML ET 150 µG/ML 104
FIGURE 62 : EXEMPLE DE CHROMATOGRAMME HPLC (FLUO: λ_{EX}=275 NM; λ_{EM}=450 NM) (A) ET SPECTRES UV CORRESPONDANT AU PRODUIT DETECTE, LA ZEA-SULFATE (TRAIT NOIR) ET ZEA (TRAIT GRIS) (B) OBTENUE A PARTIR DE L'INCUBATION DE LA SOUCHE D'*A. NIGER* CA936 EN CROISSANCE SUR DU MILIEU CONTAMINE PAR 150 µG/ML DE ZEA. 105
FIGURE 63 : EXEMPLES DE CHROMATOGRAMMES OBTENUS PAR HPLC/MS^N DANS DIFFERENTES CONDITIONS D'IONISATION. 106
FIGURE 64 : SPECTRE DE MASSE DU CONJUGUE DE LA ZEA 107
FIGURE 65 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA ZEA-SULFATE. 107
FIGURE 66 : TRANSFORMATION DE LA ZEA EN ZEA-SULFATE PAR L'ISOLAT *A. NIGER* CA936 EN CROISSANCE SUR DU MILIEU CONTAMINE PAR 50 µG/ML DE ZEA (SOIT 150 µM). 108
FIGURE 67 : PRODUCTION DE ZEA-SULFATE A PARTIR DE ZEA (50 µG/ML) PAR DIFFERENTS ISOLATS D'*ASPERGILLUS* APRES CROISSANCE PENDANT 7 JOURS A 28°C SOUS AGITATION. 108
FIGURE 68 : PROLIFERATION DES CELLULES MCF-7 EN PRESENCE DE ZEA (A.) ET D'ESTRADIOL (B.) A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (10^{-9}M A 10^{-6}M) PENDANT 4 , 5 OU 6 JOURS 109
FIGURE 69 : INDICES DE PROLIFERATION DES CELLULES MCF-7 EN PRESENCE DE SURNAGEANTS DE CULTURE DE L'ISOLAT D'*A. NIGER* CA936 INCUBE AVEC 50 µG/ML DE ZEA A DIFFERENTS TEMPS D'INCUBATION A SAVOIR T_0 , 6H , 17H, 24H, 30H, 48H, 72H, 96H AUX DILUTIONS 10 000 ET 100 000. 110
FIGURE 70 : INDICES DE PROLIFERATION DES CELLULES MCF-7 EN PRESENCE DE ZEA ET DE ZEA-SULFATE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (DE 1 PM A 1 µM). 110

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE 2

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 6

CHAPITRE 1 : LES MYCOTOXINES 6

I LES DIFFERENTS TYPES DE MYCOTOXINES 6

I.1 STRUCTURES CHIMIQUES DES MYCOTOXINES 6

I.1.1 Les aflatoxines 6

I.1.2 Les ochratoxines 6

I.1.3 La zéaralénone 7

I.1.4 Les trichothécènes 7

I.1.5 Les fumonisines 7

I.2 MECANISMES D'ABSORPTION ET EFFETS TOXIQUES DES MYCOTOXINES 8

I.2.1 Généralités sur la métabolisation des xénobiotiques chez l'homme 8

I.2.2 Métabolisation et effets toxiques des mycotoxines 9

I.3 METHODES D'ANALYSES DES MYCOTOXINES 14

II LES MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE MYCOTOXINES 15

II.1 LES MOISISSURES TOXINOGENES 15

II.1.1 Généralités 15

II.1.2 Habitat naturel de ces moisissures toxinogènes 16

II.1.3 Utilisation industrielle de ces moisissures 17

II.2 RISQUE DE CONTAMINATION PAR LES MYCOTOXINES 17

II.2.1 Conditions propices à la contamination fongique 17

II.2.2 Contamination fongique et mycotoxines 17

II.2.3 Moisissures et mycotoxines dans la chaîne alimentaire 17

III REGLEMENTATION DES MYCOTOXINES ET IMPACT ECONOMIQUE 18

III.1 EVALUATION DU RISQUE MYCOTOXIQUE 18

III.2 REGLEMENTATION SUR LES MYCOTOXINES 19

III.3 REGLEMENTATION ET ECONOMIE 20

CHAPITRE 2 : METHODES DE REDUCTION DU TAUX DE MYCOTOXINES DANS LES ALIMENTS 22

I STRATEGIE PREVENTIVE : CONTROLE DU DEVELOPPEMENT DES MOISISSURES 22

I.1 PRATIQUES RECOMMANDEES AU CHAMP POUR LIMITER LA CONTAMINATION FONGIQUE 22

I.2 PRATIQUES DE STOCKAGE 23

II ELIMINATION DES MYCOTOXINES PRESENTES DANS LES ALIMENTS 24

II.1 GENERALITES 24

II.2 DIMINUTION DE LA BIODISPONIBILITE DES MYCOTOXINES PAR ADSORPTION 24

II.2.1 Principe du piégeage des mycotoxines 24

II.2.2 Adsorbants minéraux 24

II.2.3 Adsorbants biologiques 28

II.2.4 Synthèse sur l'efficacité d'adsorption des différentes mycotoxines 31

II.2.5 Stratégie de validation de l'efficacité d'un adsorbant 31

II.3 TRANSFORMATION DES MYCOTOXINES 32

II.3.1 Transformation par des méthodes physico-chimiques 32

II.3.2 Détoxication de mycotoxines par transformation 33

II.3.3 Stratégie de validation de l'efficacité d'un procédé de transformation 43

III SYNTHESE 44

MATERIEL ET METHODES 48

I MATERIEL 48

I.1 PRODUITS CHIMIQUES 48
I.2 MILIEUX DE CULTURE 48
I.2.1 Milieux de culture pour les moisissures et actinomycètes 48
I.2.2 Milieux de culture et lignée cellulaire MCF-7 49
I.3 MICROORGANISMES UTILISES 49
I.4 ADSORBANTS COMMERCIAUX UTILISES 50

II METHODES 50

II.1 PREPARATION DE L'INOCULUM ET CONSERVATION DES SOUCHES 50
II.2 QUANTIFICATION DES MYCOTOXINES PAR HPLC 50
II.3 MESURE DE LA CAPACITE D'ADSORPTION IN VITRO DES MYCOTOXINES 52
II.3.1 Adsorption des mycotoxines in vitro dans du milieu simple tamponné 52
II.3.2 Essais d'adsorption in vitro des mycotoxines sur aliment naturellement contaminé 56
II.4 ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DE SURFACE 57
II.4.1 Observation au microscope électronique à balayage 57
II.4.2 Analyse de la composition chimique de surface par spectroscopie par bombardement de la surface par rayons X (analyse ESCA ou XPS) 57
II.4.3 Mesure de l'hydrophobicité de surface 59
II.4.4 Mesure du potentiel zéta 59
II.5 DETOXICATION IN VITRO DE LA ZEA 60
II.5.1 Métabolisation de la ZEA par du mycélium en croissance 60
II.5.2 Essai de conversion de la ZEA par des cellules entières 61
II.5.3 Essai de conversion de la ZEA par de l'extrait brut ou des fractions protéiques 62
II.5.4 Détection de l'activité de transformation de la ZEA 62
II.6 DETERMINATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DU PRODUIT FORME 62
II.6.1 Mise en évidence de la présence d'un conjugué 62
II.6.2 Purification du conjugué 63
II.6.3 Détermination de la masse exacte du conjugué 63
II.6.4 Confirmation de la structure par hydrolyse enzymatique 63
II.7 CULTURE DES CELLULES MCF-7 ET TEST DE PROLIFERATION 63
II.7.1 Mise en culture des cellules MCF-7 63
II.7.2 Maintien en culture des cellules MCF-7 64
II.7.3 Passage des cellules 64
II.7.4 Mise en conservation d'une culture cellulaire 64
II.7.5 Test de prolifération 65
II.8 ANALYSES STATISTIQUES 66

RESULTATS ET DISCUSSION 70

CHAPITRE 1 : MISE EN EVIDENCE *IN VITRO* DE L'ADSORPTION DE LA ZEARALENONE SUR DES SPORES D'*ASPERGILLUS* DE LA SECTION NIGRI 74

I ADSORPTION DE LA ZEARALENONE PAR DES SPORES DE DIFFERENTES SOUCHES D'*ASPERGILLUS* DE LA SECTION NIGRI74

II CARACTERISATION DE L'ADSORPTION SPORES/ZEA 75

II.1 CONFIRMATION DU PHENOMENE D'ADSORPTION 75
II.1.1 Test d'adsorption par des spores inactivées 75
II.1.2 Efficacité réelle de l'adsorption par les spores 76
II.2 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SPORES SUR L'EFFICACITE D'ADSORPTION 77
II.3 INFLUENCE DU PH SUR L'EFFICACITE D'ADSORPTION 78

III MODELISATION DE L'ADSORPTION SPORES-ZEA 79

IV ETUDE DE L'ADSORPTION SPORES/ZEA EN CONDITIONS PROCHES DE L'APPLICATION INDUSTRIELLE 80

IV.1 ADSORPTION DE LA ZEA DANS UN MIME DE SYSTEME DIGESTIF 80
IV.2 ADSORPTION EN CONDITIONS SOLIDES 80
IV.3 ADSORPTION EN MILIEU COMPLEXE SUPPLEMENTE EN ZEA 81

V ADSORPTION PAR LES SPORES D'AUTRES MYCOTOXINES (OTA, FB1) 81
VI COMPARAISON AVEC D'AUTRES ADSORBANTS COMMERCIAUX 82
VII DISCUSSION 84
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DE L'INTERACTION MYCOTOXINES/SPORES 86
I ANALYSE DE LA SURFACE DES SPORES 86
I.1 OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA SURFACE DES SPORES 86
I.2 ANALYSE CHIMIQUE GLOBALE DE LA SURFACE DES SPORES 86
I.3 HYDROPHOBICITE DE LA SURFACE DES SPORES 88
I.4 CHARGE DE SURFACE DES SPORES 89
II DISCUSSION 90
CHAPITRE 3 : MISE EN EVIDENCE DE L'ELIMINATION DE LA ZEARALENONE PAR DES SOUCHES D'*ASPERGILLUS* DE LA SECTION NIGRI 94
I CRIBLAGE DE SOUCHES SUR LEUR CAPACITE A ELIMINER LA ZEARALENONE 94
II CINETIQUES D'ELIMINATION 94
III ESSAIS DE CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE CHEZ L'ISOLAT *A. NIGER* CA936 97
III.1 ETUDES PRELIMINAIRES SUR L'ACTIVITE DE DEGRADATION DE LA ZEA 97
III.1.1 Localisation de l'élimination de la ZEA 97
III.1.2 Preuve d'une activité enzymatique 97
III.2 TESTS DE TRANSFORMATION DE LA ZEA PAR DES FRACTIONS PURIFIEES 98
III.2.1 Essai de transformation de la ZEA par l'extrait brut 98
III.2.2 Essais de transformation de la ZEA par des fractions protéiques intracellulaires 99
III.3 ESSAIS DE TRANSFORMATION DE LA ZEA PAR DU MYCELIUM EN CROISSANCE SUR DU MILIEU MINERAL 100
IV DISCUSSION 101
CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DU PRODUIT DE TRANSFORMATION DE LA ZEARALENONE PAR DES SOUCHES D'*ASPERGILLUS* DE LA SECTION NIGRI 104
I DETECTION D'UN PRODUIT DE TRANSFORMATION 104
II DETERMINATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DU PRODUIT 105
II.1.1 Identification du produit de transformation 105
II.1.2 Détermination de la structure chimique du produit 106
III EFFICACITE DE LA TRANSFORMATION 107
III.1 TRANSFORMATION DE LA ZEA EN ZEA-SULFATE PAR A. NIGER CA936 107
III.2 TRANSFORMATION DE LA ZEA EN ZEA-SULFATE PAR D'AUTRES ISOLATS 108
IV DETERMINATION DE LA TOXICITE DE LA ZEA-SULFATE 109
IV.1 MISE AU POINT DU TEST DE PROLIFERATION 109
IV.2 PROLIFERATION EN PRESENCE DE ZEA-SULFATE 109
V DISCUSSION 111
CONCLUSION GENERALE 116
PERSPECTIVES ENVISAGEES 117
REFERENCES 120
TABLES DES ANNEXES 140

Introduction générale

Introduction générale

Connues depuis des siècles, les mycotoxines sont des toxines naturelles produites par des moisissures. Elles peuvent contaminer une large gamme de denrées alimentaires, des matières premières aux produits transformés. Leurs effets toxiques sur l'homme et l'animal, multiples et méconnus, leur stabilité, et leur présence sur de nombreux produits agricoles justifient l'attention croissante qui leur est portée (nombreuses recherches en cours, renforcement de la législation en Europe).

Les épisodes majeurs de contamination de mycotoxines dans l'histoire sont nombreux. Au Moyen-Age, par exemple, le « Mal des Ardents » ou « Feu de Saint-Antoine », maladie à laquelle on attribuait une cause surnaturelle, fut identifié comme l'ergotisme, gangrène due à l'absorption de seigle contaminé par des alcaloïdes de l'ergot produits par la moisissure *Claviceps purpurea* (Bové, 1970 ; Beardall et Miller, 1994). Les fusariotoxines et essentiellement la toxine T-2, sont considérées comme responsables du déclin de la civilisation Étrusque (Schoenthal, 1991) et de la crise athénienne cinq siècles avant J.-C (Schoenthal, 1994). Certains tombeaux égyptiens ont également été suspectés de renfermer des moisissures sécrétant une mycotoxine, l'ochratoxine A (OTA), qui aurait été responsable de la « malédiction des Pharaons » (Pittet, 1998). La littérature vétérinaire rapporte de nombreux cas de mycotoxicoses, notamment le syndrome de Turkey X ou « maladie de la dinde », qui a décimé en Angleterre des milliers de dindes, de canetons et autres animaux domestiques dans les années 1960. Elle a permis de découvrir les aflatoxines, mycotoxines produites par *Aspergillus flavus* en quantités importantes dans la farine d'arachide importée d'Amérique latine dont se nourrissaient les volatiles. L'existence des mycotoxines n'est donc pas récente. En janvier 2003, une polémique éclate après la parution d'un article de « 60 millions de consommateurs » se basant sur une étude évaluant le taux de mycotoxines dans des céréales pour petit-déjeûner. Sur 40 produits testés, la moitié contienne de l'OTA avec une valeur maximale de 8,9 µg/kg. Les consommateurs commencent à prendre conscience du danger lié aux mycotoxines. De nombreux produits sont régulièrement retirés du marché à cause d'une contamination en mycotoxines plus élevée que le seuil admis. La dernière intoxication a été observée au Kenya en 2004. 317 cas d'intoxications sévères dont 125 cas mortels dues à l'aflatoxine ont été observés (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005).

Les mycotoxines se retrouvent dans une large variété de produits agricoles dont les céréales, les fruits secs, les noix, le café, et ce, partout dans le monde. La contamination par des mycotoxines peut être provoquée par certaines conditions environnementales au champ, des procédés mal maîtrisés de récolte, de stockage et de transformation. Parmi les différentes sortes de mycotoxines, une vingtaine d'entre elles sont considérées comme présentant un risque pour le consommateur et comme ayant un impact sur l'économie de nombreux pays. Par exemple, chez l'homme, les aflatoxines dont l'aflatoxine B1 (AFB1) et l'OTA ont été classées comme cancérogènes avérés par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC).

Près de 300 métabolites potentiellement toxiques provenant des moisissures contaminent 25 à 40 % des productions céréalières mondiales, à des niveaux mesurables (Pittet, 1998; Yiannikouris et Jouany, 2002b).

Pour être efficace, le contrôle du niveau de contamination des aliments exige l'emploi de stratégies variées et complémentaires et ce à différentes étapes de l'élaboration de l'aliment. Des méthodes préventives telles que des pratiques culturales adaptées existent pour diminuer le risque de prolifération de moisissures. Cependant, l'élimination totale du risque fongique et mycotoxique est impossible (CAST, 2003). Les stratégies impliquant le tri et/ou la destruction des denrées contaminées sont peu réalistes du fait de leur coût économique important. Par ailleurs, la dilution des aliments contaminés afin d'abaisser le niveau de contamination en-dessous des normes

réglementaires, a été interdite en Europe à partir de juillet 2003. Une façon d'augmenter la qualité sanitaire des aliments est l'utilisation de ligands minéraux et organiques ou de micro-organismes détoxifiant les mycotoxines afin de limiter l'absorption des mycotoxines dans l'organisme de l'animal. Ceci permettrait de contrecarrer les effets néfastes des mycotoxines. De nombreuses études ont été effectuées dans ces domaines mais peu d'entre elles ont des applications faisables techniquement et économiquement. Le but de notre étude a été d'étudier d'autres pistes possibles de décontamination de matières premières contaminées. Par ailleurs, la thèse étant en relation avec un industriel, le but était également d'explorer d'autres matériaux non brevetés capables d'adsorber les mycotoxines ou de les transformer.

Le travail de thèse présenté dans ce document a eu, dans une première partie, pour but de caractériser l'adsorption de mycotoxines sur des spores d'*Aspergillus* de la section Nigri, non toxinogènes, et d'élucider le(s) mécanisme(s) chimique(s) d'adsorption de plusieurs mycotoxines, et plus particulièrement de la zéaralénone (ZEA), à ces spores. En effet, peu de solutions d'élimination efficaces existent contre cette mycotoxine qui pose de graves problèmes notamment chez le porc. Nous avons choisi de nous focaliser sur les mycotoxines suivantes : l'OTA, la ZEA, la fumonisine B1 (FB1). En effet, nous ne nous sommes pas intéressés à l'aflatoxine B1 (AFB1), mycotoxine posant de nombreux problèmes car cette mycotoxine est facilement adsorbable par de nombreux matériaux déjà existants. L'efficacité d'autres adsorbants commerciaux a également été comparée à l'adsorption observée avec les spores.

Dans une deuxième partie, la sulfo-conjugaison de la ZEA comme moyen de détoxication a été étudiée. La toxicité de la ZEA-sulfate a été évaluée par test de prolifération cellulaire de lignée cellulaire Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7).

Etude bibliographique

Etude bibliographique

Chapitre 1 : Les mycotoxines

I Les différents types de mycotoxines

I.1 Structures chimiques des mycotoxines

Les mycotoxines (du grec « mycos » : champignon) sont des molécules de faible masse moléculaire issues du métabolisme secondaire des moisissures. Il en existe 300 à 400 types. Elles appartiennent à des familles chimiques très diverses de molécules.

I.1.1 Les aflatoxines

Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proches (un assemblage d'une coumarine et de 3 furannes). Les plus courantes sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFM1, l'AFG1 et l'AFG2 (cf Figure 1). Le cycle lactone de l'AFB1 semble être responsable en majorité de sa toxicité (Lee *et al.*, 1981).

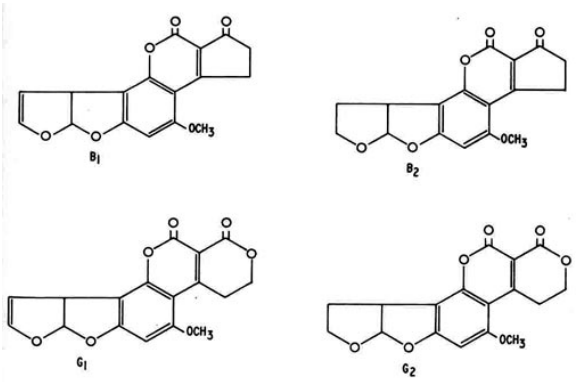


Figure 1 : Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1 et G2.

I.1.2 Les ochratoxines

Les ochratoxines constituent une famille de toxines contenant une isocoumarine parfois chlorée couplée par une liaison amide à une molécule de L-phénylalanine. Parmi les 3 ochratoxines existantes (OTA, OTB, OTC), l'OTA est la plus fréquemment rencontrée (cf Figure 2).

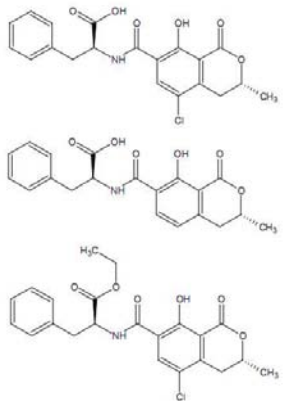


Figure 2 : Structures chimiques des ochratoxines (A, B et C du haut vers le bas).

I.1.3 La zéaralénone

La ZEA est une lactone de l'acide résorcyclique (cf Figure 3).

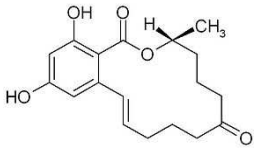


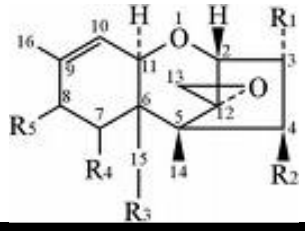
Figure 3 : Structure chimique de la zéaralénone.

I.1.4 Les trichothécènes

Les trichothécènes sont une grande famille de mycotoxines (cf Figure 4) composées de 4 groupes :

- Groupe A : constitué par les trichothécènes qui n'ont pas de fonction cétone en C8. Les plus importants sont la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS).
- Groupe B : constitué par les trichothécènes ayant une fonction cétone en C8. Les plus importants sont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées, le nivalénol (NIV), et la fusarénone-X (FX).
- Groupe C : constitué par les trichothécènes ayant un époxyde supplémentaire en C7 comme la crotocine.
- Groupe D : constitué par les trichothécènes ayant un macrocycle entre C4 et C15. Les plus importants sont les verrucarines, les roridines et les satratoxines.

Les groupes A et B et notamment les toxines T-2, HT-2 et le DON sont les plus importants en termes de prévalence naturelle.

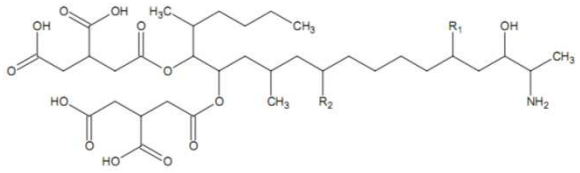


	R1	R2	R3	R4	R5
Toxine T-2	OH	CH_3COO^-	CH_3COO^-	H	$(CH_3)_2CHCH_2COO^-$
DON	OH	H_2	OH	OH	O

Figure 4 : Structures chimiques des trichothécènes.

I.1.5 Les fumonisines

Les fumonisines forment une famille d'environ 15 molécules dont les fumonisines B1, B2, B3, B4 (cf Figure 5).



	R1	R2
FB1	OH	OH
FB2	OH	H
FB3	H	OH
FB4	H	H

Figure 5 : Structures chimiques des fumonisines.

I.2 Mécanismes d'absorption et effets toxiques des mycotoxines

I.2.1 Généralités sur la métabolisation des xénobiotiques chez l'homme

Les xénobiotiques, dont font partie les mycotoxines, subissent quelques étapes de métabolisation et d'excrétion, différentes selon leurs caractéristiques physico-chimiques, avant d'être excrétés par les voies urinaires et fécales (cf Figure 6). L'absorption et l'excrétion des xénobiotiques impliquent différents organes en particulier le foie et le rein (cf Figure 7).

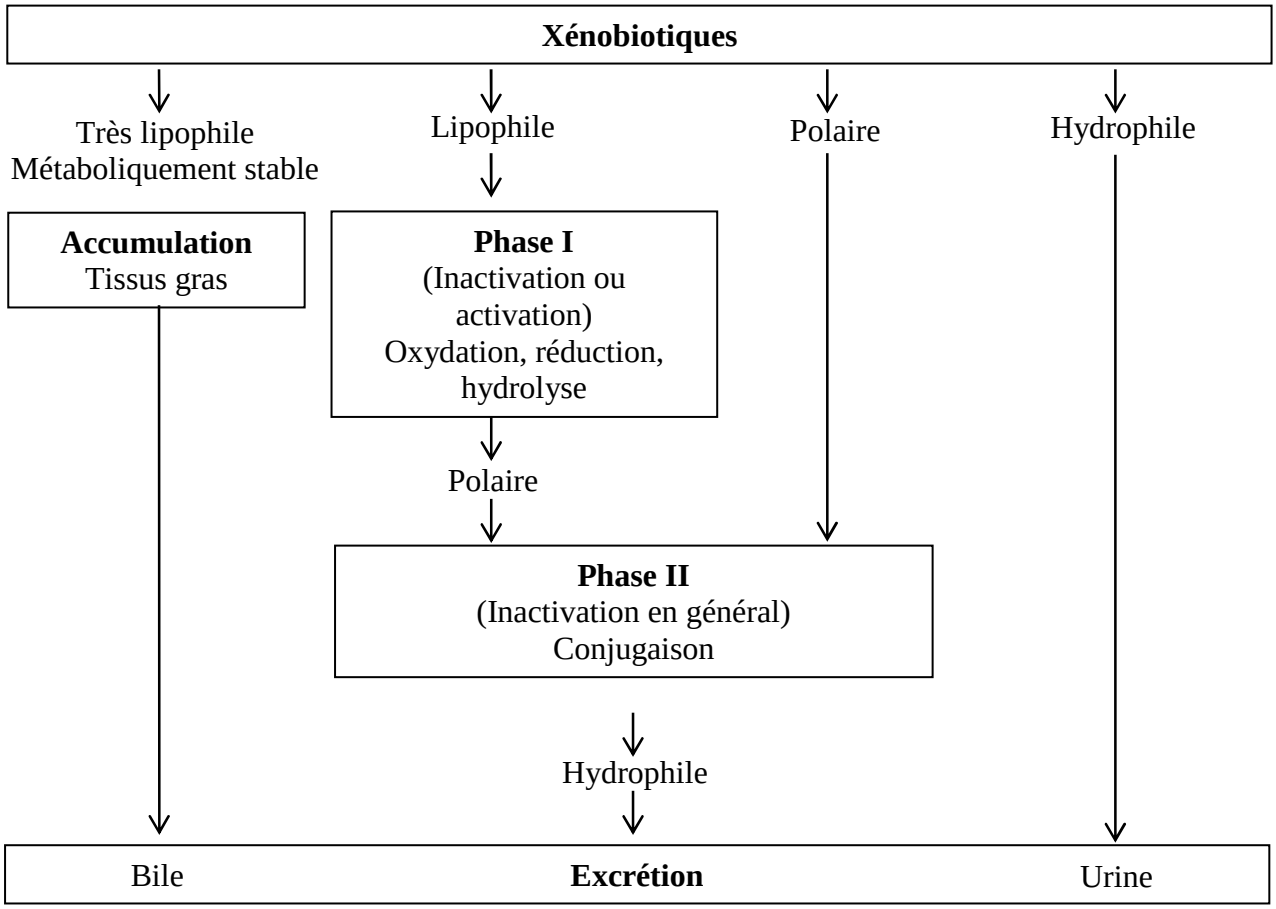


Figure 6 : Voie générale de métabolisation et d'excrétion de xénobiotiques (d'après Pussa, 2007).

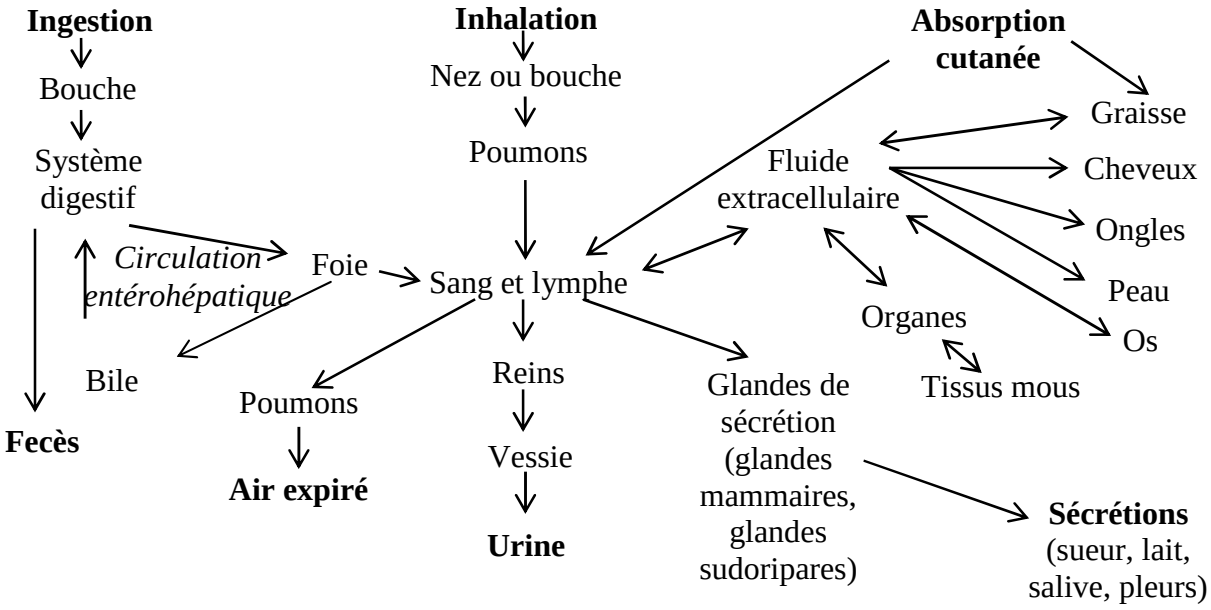


Figure 7 : Principales voies de distribution, d'absorption et d'excrétion des molécules toxiques (d'après Pussa, 2007).

I.2.2 Métabolisation et effets toxiques des mycotoxines

La diversité des structures chimiques des mycotoxines entraîne une diversité d'effets toxiques. Selon le type de mycotoxines, elles peuvent avoir des effets génotoxiques (induisant des mutations génétiques), tératogènes (provoquant un développement anormal de l'embryon), cancérogènes (induisant des cancers), immunosupresseurs (induisant une dépression du système immunitaire), oestrogéniques (mimant les hormones). Les effets toxiques des mycotoxines sont résumés sur le Tableau 1.

Tableau 1: Tableau récapitulatif de la toxicité de différentes mycotoxines (à partir d'AFSSA, 2009).

Mycotoxines	Génotoxique	Tératogène	Cancérogène	Immuno-suppresseur	Oestro-génique
AFB1	*	*	*	*	
OTA	*		*	*	
ZEA		*			*
DON				*	
T-2, HT-2				*	
FB1	*	*		*	

I.2.2.1 L'aflatoxine B1

L'AFB1 est de loin la plus toxique des mycotoxines. L'AFB1 est principalement transformée dans le foie en 8 métabolites: l'époxyde-AFB1, l'AFM1, l'AFB2, l'AFQ1, l'AFP1, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H1 et l'aflatoxicol M1 (cf Figure 8). Ces métabolites à l'exception de l'époxyde et de l'AFM1 sont généralement moins toxiques. Le foie semble être la principale cible de l'AFB1 (Sudakin, 2003 ; Richard, 2007). Elle est d'ailleurs prouvée comme responsable, en partie, du cancer du foie (Jackson et Groopman, 1999). En effet, les aflatoxines agissent comme des intercalants à

l'ADN en créant des liaisons avec les bases guanines (Bren *et al.*, 2004) et entraînent la formation de cellules cancéreuses.

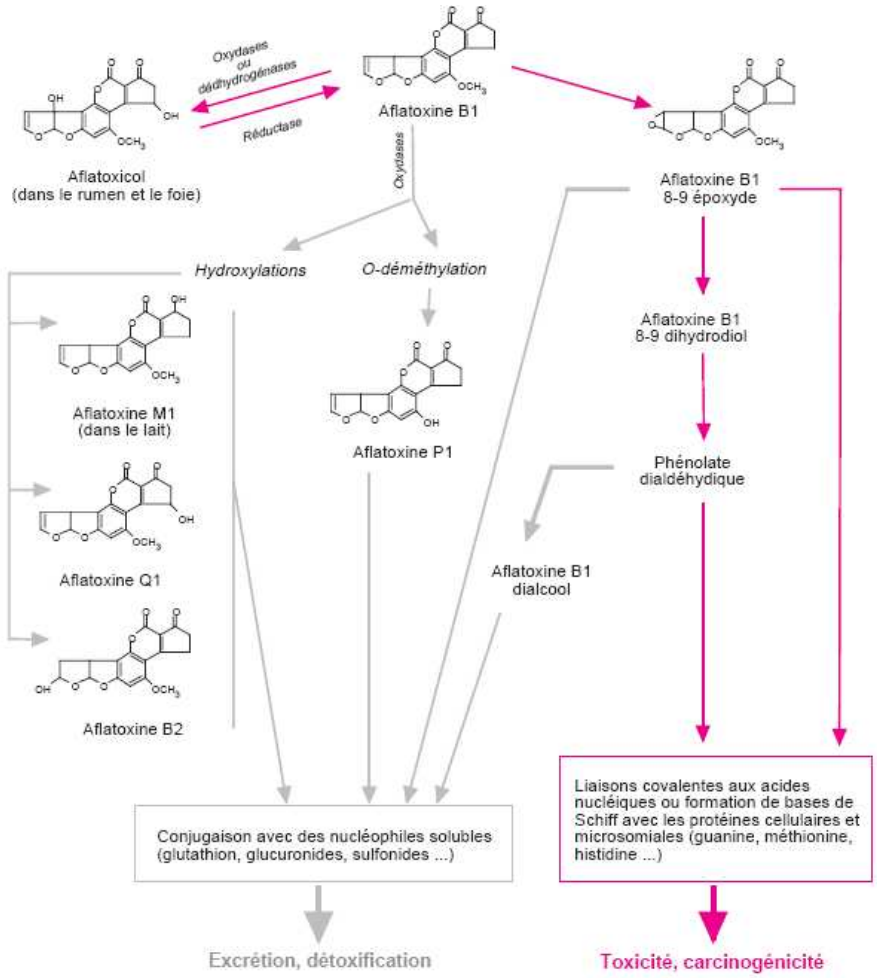


Figure 8 : Métabolisme de l'aflatoxine B1 dans le foie (d'après Yiannikouris et Jouany, 2002).

I.2.2.1 L'ochratoxine A

L'OTA est absorbée tout d'abord au niveau de l'estomac. Elle peut également être absorbée dans l'intestin grêle où elle est hydrolysée en ochratoxine α ou OTα (non toxique) par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine. Au niveau du foie, l'OTA est transformée en métabolites mineurs (cf Figure 9) qui permettent une détoxication partielle.

Chez l'homme, l'OTA est associée à la survenue d'une pathologie nommée néphropathie endémique des balkans (Mally *et al.*, 2007). Cela consiste en une très forte anémie puis une insuffisance rénale.

Les ochratoxicoses chez les animaux se manifestent par des dommages rénaux, une anorexie accompagnée d'une perte de poids, des vomissements, l'apparition de conjonctivites.

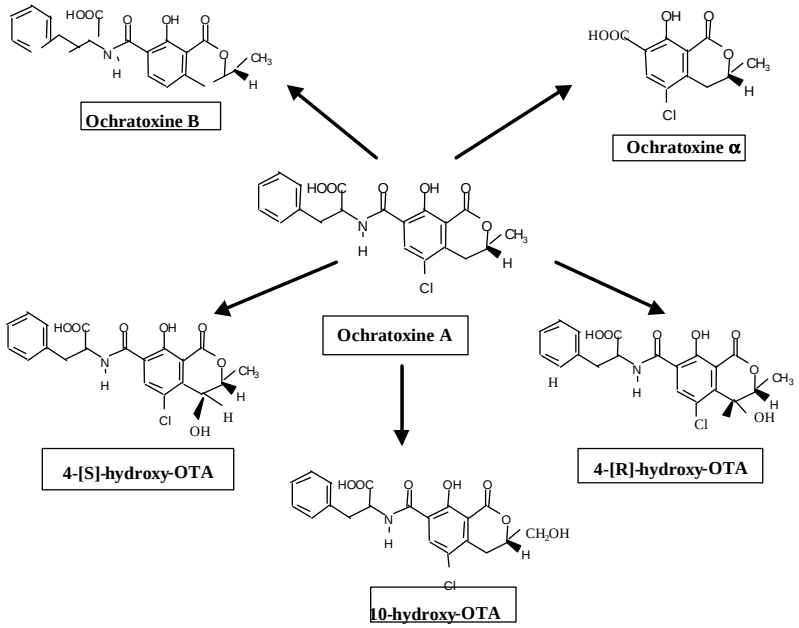


Figure 9 : Métabolisme de l'OTA dans le foie (d'après Pfohl-Leszkowicz, 1999).

I.2.2.2 La zéaralénone

Les propriétés physiques et chimiques de la ZEA et notamment son hydrophobicité sont des caractéristiques favorables à une large diffusion à l'intérieur des tissus. Les différentes études de pharmaco-cinétique montrent d'ailleurs que la ZEA est absorbée rapidement après administration orale (Ramos *et al.*, 1996) et peut être métabolisée par le tissu intestinal (Videmann *et al.*, 2008). La ZEA et ses dérivés ont la capacité de se fixer de façon compétitive sur les récepteurs oestrogéniques cellulaires. La ZEA est donc un pertubateur endocrinien. Sa fixation est due à sa capacité à adopter une conformation similaire aux oestrogènes naturels tels que le 17β-estradiol (cf Figure 10). L'énantiomère R de la ZEA, n'ayant pas la même conformation, n'a aucune activité oestrogénique.

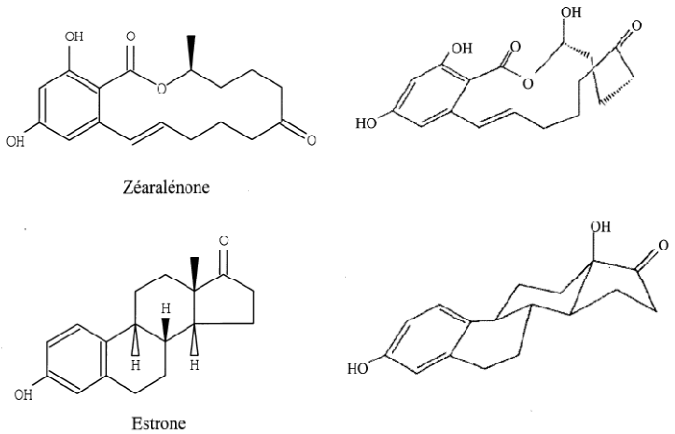


Figure 10 : Conformations de la zéaralénone et d'estrogène naturel (extrait de Gaumy *et al.*, 2001).

Chez l'homme, la ZEA est suspectée d'une vague de changements pubertaires chez des milliers de jeunes enfants à Porto-Rico. Des toxicoses aux Etats-Unis, en Chine, au Japon et en Australie ont été liées à la présence de ZEA dans les denrées alimentaires (Bilgrami et Choudhary, 1998).

Les différentes propriétés d'absorption, de distribution, de biotransformations et d'excrétion de la ZEA chez différents animaux ont été résumées par Gaumy *et al.* (2001). Plusieurs métabolites

tels que les α et β zéaralénols et α et β zéaralanols (cf Figure 11) peuvent être formés. Ils peuvent ensuite subir une glucurono-conjugaison (JEFCA, 2000). L'α- zéaralénol est un métabolite 3 à 4 fois plus actif que la molécule initiale. Le porc est particulièrement sensible à la ZEA (Zinedine *et al.*, 2007). Le taux de survie de l'embryon est notamment diminué pour les femelles en gestation ayant ingéré de la ZEA (Osweiler *et al.*, 1990).

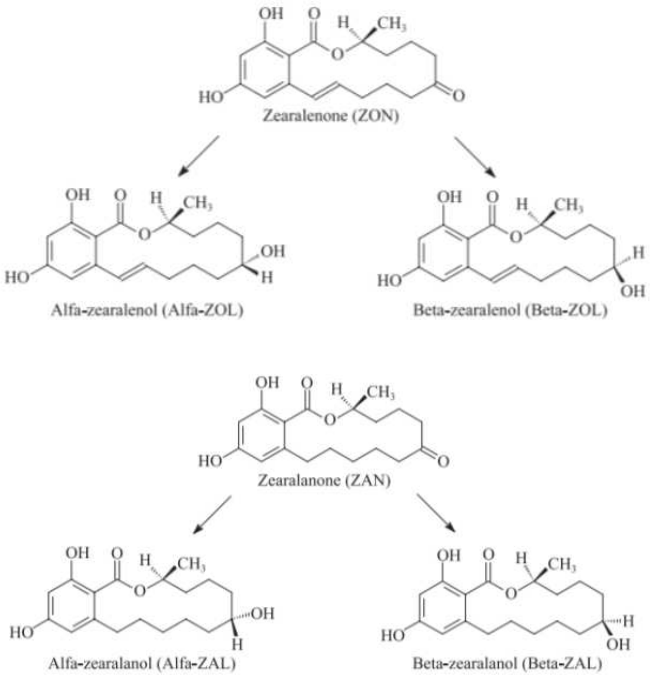


Figure 11 : Structures chimiques de la zéaralénone et de ses dérivés tels que les α-zéaralenol, β-zéaralenol, zéaralanone, α-zéaralanol, β-zéaralanol (extrait de Shaut *et al.*, 2008).

I.2.2.3 Les trichothécènes

- La toxine T-2

Chez l'homme, la toxine T-2 injectée dans la lumière intestinale passe rapidement dans le sang et est métabolisée sous forme de toxine HT-2 et autres produits de désestérification. Elle est ensuite distribuée dans l'organisme où elle se localise de préférence dans les reins, le foie, la rate et la graisse. Elle est excrétée par l'urine, la bile et les féces (AFSSA, 2009). La toxine T-2 est probablement à l'origine de l'aleucie toxique alimentaire (IARC, 1993b), maladie qui a touché des milliers de personnes en Sibérie pendant la seconde guerre mondiale.

Elle provoque, chez l'animal, une perte de poids, des vomissements, des dermatoses sévères et des hémorragies pouvant entraîner la mort. La toxine T-2 possède des propriétés immunosuppressives intervenant à la fois sur le système immunitaire des cellules et sur le nombre de macrophages, de lymphocytes et d'érythrocytes (Parent-Massin, 2004). Elle inhibe la synthèse protéique et la synthèse d'ADN et d'ARN (Richard, 2007).

- Le DON

La biodisponibilité du DON est extrémement variable selon les espèces animales, allant de 10% chez les ovins à plus de 50% chez le porc (AFSSA, 2009). Le DON, communément appelée vomitoxine, provoque des vomissements chez le porc (Richard, 2007) induisant une réduction de la consommation alimentaire, une diminution du gain de poids et des perturbations de certains paramètres sanguins dont le taux d'immunoglobulines sériques (Rotter *et al.*, 1996).

I.2.2.4 Les fumonisines

Chez l'homme, la FB1 est immunotoxique et peut induire des effets indésirables sur le système cardio-vasculaire. De manière générale, les fumonisines provoquent des lésions profondes du foie, du tractus gastro-intestinal, du système nerveux et des poumons (Zomborszky-Kovács *et al.*, 2002). La FB1 agit sur la voie de biosynthèse des sphingolipides en inhibant de façon compétitive l'activité de la céramide synthase (Soriano *et al.*, 2005). Cette perturbation de la synthèse des sphingolipides entraîne une accumulation de bases sphingoïdes (la sphinganine et la sphingosine) et une déplétion en céramide et en sphingolipides complexes (cf Figure 12).

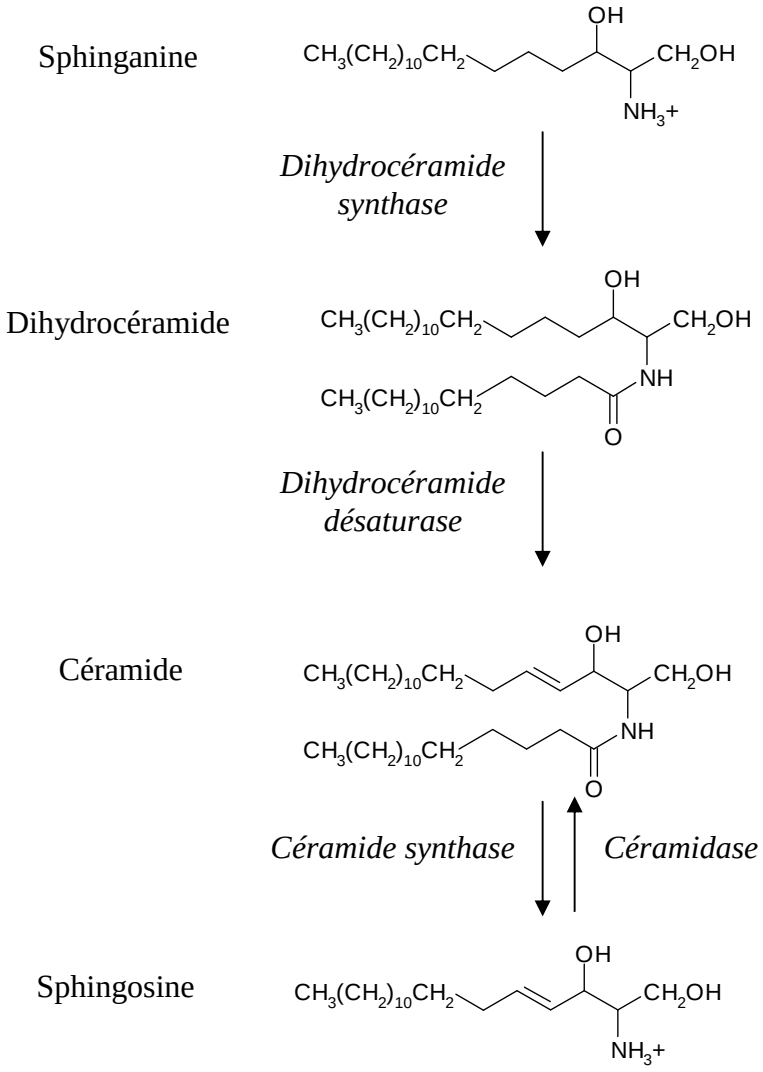


Figure 12 : Métabolisme de la biosynthèse des bases sphingoïdes.

Chez l'animal, après administration par voie orale, la FB1 est faiblement absorbée et se retrouve majoritairement dans les féces. La biodisponibilité de la FB1 est évaluée de 1 à 6% selon l'espèce (AFSSA, 2009). La majeure partie de la toxine absorbée se retrouve dans le foie et les reins. Chez le porc, à dose élevée, elles peuvent également inhiber l'action des macrophages pulmonaires responsables de l'élimination des pathogènes (Cheng *et al.*, 2006) et induisent une pathologie caractéristique : l'œdème pulmonaire (Haschek *et al.*, 2001).

I.2.2.5 Synergie entre différentes mycotoxines

Des effets de synergie peuvent exister entre plusieurs toxines (Tajima *et al.*, 2002 ; Luongo *et al.*, 2006 ; McKean *et al.*, 2006 ; Tammer *et al.*, 2007 ; Bouslimi *et al.*, 2008 ; Klarić *et al.*, 2008). Par exemple, la citrinine et l'OTA ensemble provoquent la mort cellulaire de cellules Véro (80% de mortalité) alors que l'effet pour chacune de ces mycotoxines seule est beaucoup moins important à savoir 10% de mortalité pour la citrinine et 60% pour l'OTA (Bouslimi *et al.*, 2008). L'association de la FB1 et de l'OTA provoque également des effets synergiques sur les cellules de reins de porc (Klarić *et al.*, 2008). De plus en plus d'études considèrent une contamination multiple de plusieurs mycotoxines (Chen *et al.*, 2008).

I.3 Méthodes d'analyses des mycotoxines

Pour l'analyse des mycotoxines, habituellement présentes à l'état de traces, il existe une panoplie de méthodes analytiques basées essentiellement sur la séparation chromatographique des molécules puis leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Pour quantifier les mycotoxines présentes dans les aliments, elles sont d'abord extraites puis purifiées avant d'être détectées (cf Figure 13).

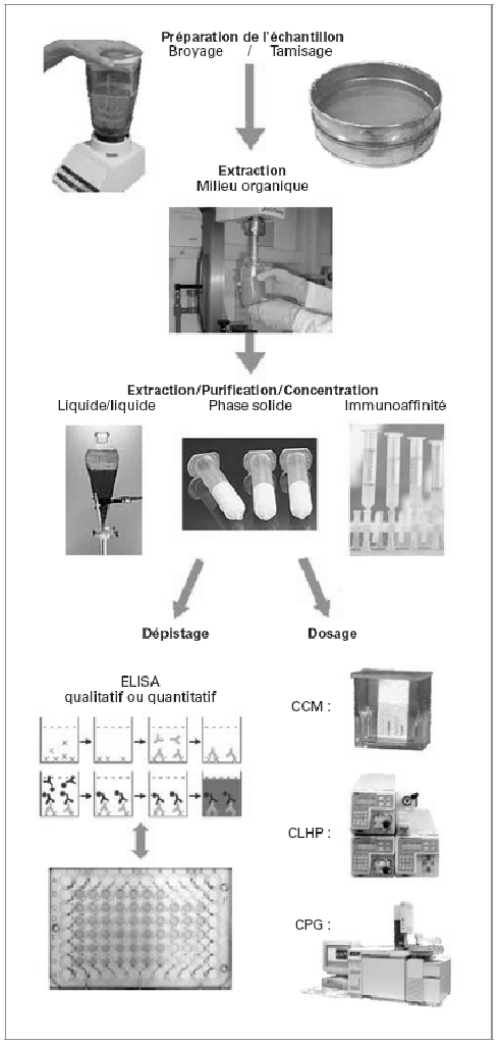


Figure 13 : Principes d'analyse des mycotoxines (extrait de Dragacci *et al.*, 2005).

Certaines méthodes de détection comme la chromatographie couche mince (CCM) et des méthodes immunochimiques tel que l' « Enzyme-liked ImmunoSorbent Assay » ou ELISA permettent une détection qualitative et semi-quantitative. Elles ont l'avantage d'être rapides et

peuvent traiter plusieurs échantillons en parallèle. Les techniques immunochimiques reposent sur l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la mycotoxine recherchée. Ces méthodes peuvent créer des faux positifs qui entraînent une surestimation des résultats. Les limites de détection sont en général de moins de 1 ppb (Barna-Vetro *et al.*, 1994).

Les méthodes de référence à savoir la chromatographie gazeuse (CPG) pour les composés volatils et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettent de quantifier de façon précise les mycotoxines. La chromatographie gazeuse est réservée à l'étude de mycotoxines qui peuvent être volatilisées par dérivatisation comme les trichothécènes (Langseth et Rundberget, 1998). La technique HPLC est la méthode la plus utilisée. Grâce au couplage avec la fluorimétrie, elle peut atteindre des limites de détection très faibles (de l'ordre de 10 ng/kg). Lorsqu'elle est combinée à une étape préalable de purification par chromatographie d'immunoaffinité, cette méthode est validée au niveau international et fait l'objet de normes. La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC/MS) est de plus en plus utilisée pour identifier les mycotoxines ou métabolites associés (Takino *et al.*, 2004 ; Spanjer *et al.*, 2008 ; Monbaliu *et al.*, 2009) car elle permet une détection simultanée de plusieurs mycotoxines. La chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC/MS) peut elle aussi être utilisée pour détecter plusieurs mycotoxines simultanément (Tanaka *et al.*, 2000).

II Les microorganismes producteurs de mycotoxines

II.1 Les moisissures toxinogènes

II.1.1 Généralités

Les microorganismes producteurs de mycotoxines sont des moisissures de différentes espèces essentiellement d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, de *Fusarium*, de *Claviceps* et d'*Alternaria* (cf Tableau 2).

Les toxines sout souvent classées en fonction de l'espèce de moisissure productrice à savoir les toxines d'*Aspergillus* (les aflatoxines et les ochratoxines) et les toxines de *Fusarium* (trichothécènes, fumonisines et ZEA). Les produits agricoles sont fréquemment contaminés par plusieurs moisissures capables de produire chacune plusieurs toxines. Par exemple, les trichothécènes, la ZEA et la FB1 (les fusariotoxines) coexistent souvent car elles peuvent être produites par les mêmes espèces de *Fusarium*.

Le rôle des mycotoxines chez les moisissures toxinogènes n'est pas encore élucidé. Elles permettraient, entre autres, de lutter contre l'invasion d'autres microorganismes (Utermark et Karlowsky, 2007).

Tableau 2 : Mycotoxines et moisissures productrices associées (AFSSA, 2009).

Mycotoxines	Principales moisissures productrices
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	*Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. nomius*
OTA	*Penicillium verrucosum, P. nordicum, Aspergillus ochraceus, A. carbonarius, A. niger*
Patuline (PAT)	*Penicillium expansum, Aspergillus clavatus, Byssochlamys nivea*
FB1, FB2, FB3	*Fusarium verticillioides, F. proliferatum*
Trichothécènes (DON, toxines T-2, HT-2)	*Fusarium graminearum, F. culmorum, F. crookwellense, F. sporotrichiodes, F. poae, F. tricinctum, F. acuminatum*
ZEA	*Fusarium graminearum, F. culmorum, F. crookwellense*
Alcaloïdes de l'ergot	*Claviceps purpurea, C. paspali, C. Africana*
Citrinine	*Aspergillus terreus, A. carneus, A. niveus, Penicillium verrucosum, P. citrinium, P. expansum*
Toxines d'Alternaria (alternariol, alternariol méthyl éther…)	*Alternaria alternata, Al. solani*
Acide cyclopiazonique	*Aspergillus flavus, A. versicolor, A. tamarii, Penicillium camemberti*
Stérigmatocystine	*Aspergillus nidulans, A. versicolor, A. flavus*
Sporidesmines	*Pithomyces chartarum*
Stachybotryotoxines	*Stachybotrys chartarum*
Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrème B)	*Neotyphodium coenophialum*
Phomopsines	*Phomopsis leptostromiformis*
Toxines trémorgènes	*Penicillium roquefortii, P. crustosum, P. puberrelum, Aspergillus clavatus, A. fumigatus*

II.1.2 Habitat naturel de ces moisissures toxinogènes

Plus de 200 espèces constituent le genre *Aspergillus*. Particulièrement communes en région tropicale, certaines espèces sont cependant cosmopolites, très fréquentes dans le sol, sur débris organiques en décomposition, dans le compost, dans les entrepôts à grains, dans les épices… Les spores d'*Aspergillus* sont plus abondantes dans les espaces clos qu'à l'air libre. Elles sont souvent associées aux poussières émises lors des travaux de construction, excavation et rénovation de bâtiments. Ce sont des spores qui sédimentent rapidement, mais s'accumulent sur les surfaces et dans les poussières.

Moisissure cosmopolite, *Fusarium* s'isole du sol, de l'eau, de l'air et de nombreux végétaux qu'il parasite le plus souvent, entraînant des pertes sévères dans les cultures.

De tous les champignons, c'est probablement *Penicillium* le plus ubiquiste. En effet, il comporte plus de 200 espèces qui se rencontrent partout de l'équateur aux pôles : dans le sol, sur des débris organiques, dans le compost, sur les fruits et légumes. Les espèces de *Penicillium* sont des contaminants fréquents de l'air, tant dans les logements qu'à l'extérieur. Leurs spores s'isolent toute l'année. De nombreuses espèces sont susceptibles de se rencontrer dans l'habitat humide.

Pathogène de végétaux, *Alternaria* est cosmopolite et se comporte surtout comme un parasite de faiblesse et se développe sur des plantes sénescentes, sur des débris organiques divers, sur le sol, sur des produits alimentaires, sur le papier…

II.1.3 Utilisation industrielle de ces moisissures

Certaines de ces espèces de moisissures sont utilisées industriellement dans de nombreux domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé…). Ces souches utilisées sont inoffensives et utilisées comme auxiliaires technologiques. Il n'y a donc aucun risque de contamination des aliments produits par des mycotoxines. Par exemple, *Penicillium roquefortii* et *P. camembertii* sont utilisés pour la production de fromages. D'autres moisissures sont utilisées pour la production d'enzymes (protéases produites par *A. niger*), de médicaments (production de pénicilline par *P. chrysogenum*). *F. graminareum* est utilisé pour produire une mycoprotéine vendue comme aliment protéique d'origine végétale.

II.2 Risque de contamination par les mycotoxines

II.2.1 Conditions propices à la contamination fongique

Les produits agricoles peuvent être contaminés par des moisissures soit en plein champ (principalement *Fusarium*, *Alternaria*) ou lors du stockage (principalement *Penicillium* et *Aspergillus*). Les espèces de moisissures ont leurs caractéristiques propres de croissance. Par exemple, la gamme de température dans lesquelles elles peuvent pousser varie en fonction des espèces (cf Tableau 3). On ne peut donc pas retrouver toutes les espèces selon les conditions de température de l'environnement.

Tableau 3 : Températures caractéristiques de croissance de quelques *Aspergilli, Penicillia* et *Fusarium*.

Espèces fongiques	T_{min}	T_{opt}	T_{max}
Aspergillus flavus	15	35	44
Aspergillus clavatus	10	25	37
Penicillium aurantiogriseum	8	24	28
Penicillium purpurogenum	12	28	35
Fusarium tricinctum	5	25	35

II.2.2 Contamination fongique et mycotoxines

Non seulement la contamination fongique des denrées alimentaires entraîne une modification de la valeur nutritive et de la qualité organoleptique de la denrée alimentaire, mais surtout entraîne, dans certains cas, la présence de mycotoxines. Même s'il y a eu contamination fongique, la présence de mycotoxines dans le produit agricole n'est pas obligatoire. En effet, les conditions de croissance des moisissures diffèrent des conditions de mycotoxinogénèse. Chaque espèce ou isolat croît dans des conditions spécifiques d'humidité et de température. Ces conditions optimales de croissance peuvent différer de leurs optima de production de mycotoxines. Par exemple, *A. carbonarius* montre un optimum de croissance entre 30°C et 35°C alors que le maximum de production d'OTA de cette souche se situe à des températures comprises entre 15°C et 20°C (Mitchel *et al.*, 2004).

II.2.3 Moisissures et mycotoxines dans la chaîne alimentaire

L'entrée des mycotoxines dans la chaîne alimentaire s'effectue soit par des denrées consommées directement (arachides, pistaches, amandes, fruits secs…) soit indirectement par des produits dérivés (par ex. produits issus de la panification, céréales pour le petit-déjeûner…) (cf Tableau 4). Les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation…), s'ils agissent sur les moisissures, ne permettent pas de détruire, ou très peu les

mycotoxines (Bullerman et Bianchini, 2007). La multicontamination de denrées par les mycotoxines est fréquente (multiproduction de différentes mycotoxines par une même espèce ou production d'une seule mycotoxine par plusieurs espèces de moisissures simultanément). Il est donc fréquent de trouver plusieurs mycotoxines présentes sur un même aliment, en particulier sur les céréales, vecteurs de mycotoxines très importants car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Les mycotoxines étant peu métabolisées par les organismes vivants, elles peuvent également se retrouver dans les produits d'origine animale (lait ou produits laitiers, charcuterie…). Par exemple, l'AFM1 se retrouve dans le lait de vache (Zinedine *et al.*, 2006).

Tableau 4: Principaux champignons, mycotoxines et denrées associées (données régroupées à partir d'AFSSA, 2009).

Produits infectés	AFB1	OTA	FB1	ZEA	DON
Céréales :					
Avoine	*				*
Blé	*			*	*
Orge	*			*	*
Maïs	*	*	*	*	*
Riz	*	*	*	*	*
Seigle	*				*
Sorgho	*		*		*
Produits dérivés	*	*	*	*	*
Autres produits agricoles :					
Cacao	*	*			
Café	*	*			
Bière	*	*	*	*	*
Vin		*			
Fruits séchés	*	*		*	
Fruits secs	*	*			
Produits animaux :					
Viande				*	
Lait	*			*	
Œuf				*	

III Réglementation des mycotoxines et impact économique

III.1 Evaluation du risque mycotoxique

L'évaluation du risque mycotoxique est délicate car ce risque est d'origine naturelle (contamination fongique liée aux conditions environnementales), difficilement contrôlable, et il peut être multiple par le fait qu'une moisissure peut produire plusieurs mycotoxines. Selon l'AFSSA, l'évaluation des risques est l'évaluation de la probabilité qu'un effet indésirable sur la santé survienne à la suite de l'absorption d'une denrée alimentaire présentant un danger, dans une population, après exposition au danger. Pour caractériser les dangers, une Dose Journalière Tolérée (DJT) est fixée grâce aux études toxicologiques. Pour qu'il n'y ait pas de risque pour la santé, il faut que la quantité à laquelle un individu est exposé par jour (l'exposition) soit inférieure à la DJT. Les doses journalières tolérables et le pourcentage par rapport à la DJT en apport au 95ème percentile

(P95) de consommation pour la population générale (adultes de 15 ans et plus) sont présentés sur le Tableau 5. Une exposition se rapprochant de la DJT apparaît pour le DON et la ZEA.

Tableau 5 : Estimation des apports alimentaires des forts consommateurs (P95) pour la population générale (adultes) et des doses journalières tolérables en différentes mycotoxines (AFSSA, 2009).

Mycotoxines	DJT (ng/kg p.c./j)	Exposition en % de la DJT pour P95
OTA	120	20%
ZEA	200	35%
DON	1000	57%
FB1	2000	3%

Il n'a pas été fixé de DJT pour les aflatoxines. En effet, ces substances présentent des effets cancérogènes génotoxiques sans seuil. La seule approche réaliste est de réduire l'exposition à un niveau aussi faible que possible suivant le principe ALARA (As Low As reasonnably Achievable). L'apport au P95 est de 0,35 ng/kg/p.c./j pour les adultes de la population générale. Seul 0,01% d'individus dépassent la limite maximale fixée par la JEFCA à 1 ng/kg/p.c./j.

III.2 Réglementation sur les mycotoxines

A partir de l'évaluation du risque, un règlement peut être mis en place. Les premiers règlements visant à limiter la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires ont été élaborés en 1960, après la découverte de l'AFB1. Actuellement, environ 100 pays (couvrant environ 85% des habitants du monde) ont des réglementations concernant les mycotoxines (Van Egmond *et al.*, 2007). En France, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) joue un grand rôle pour aider les pouvoirs publics français à garantir un niveau de sécurité alimentaire satisfaisant. L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) est elle la pierre angulaire de l'Union Européenne (UE) pour ce qui concerne l'évaluation des risques relatifs à la sécurité des aliments destinés à l'alimentation humaine et animale (cf Figure 14). En étroite collaboration avec les autorités nationales, l'EFSA fournit des avis scientifiques indépendants ainsi qu'une communication sur les risques existants et émergents. Les valeurs toxicologiques d'une substance active sont alors adoptées de manière unique et commune par l'ensemble des pays de l'UE. Pour une uniformisation internationale, le *Codex Alimentarius*, créé par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) consiste en un recueil de normes, directives et recommandations valables pour tous les pays du monde.

Des teneurs maximales autorisées pour les aliments pour bétail concernant 5 mycotoxines sont en vigueur dans la communauté européenne (cf Tableau 6). Les quantités maximales autorisées dépendent des animaux pour lesquels les aliments sont destinés et de leur âge. Les denrées de consommation humaine sont bien sûr aussi contrôlées et réglementées par la commission européenne (cf Tableau 7). La réglementation des mycotoxines est pour l'instant établie sur les effets toxiques des mycotoxines seules mais des études sont en cours pour prendre en compte les synergies.

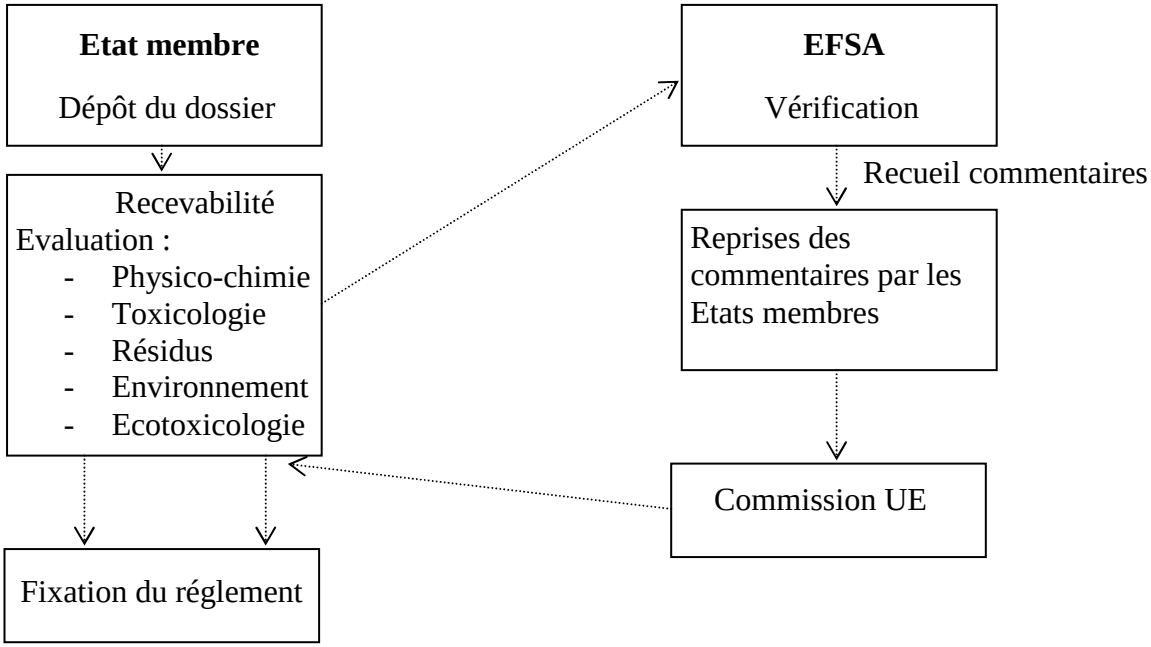


Figure 14: Différents organismes impliqués dans la législation de résidus.

Tableau 6 : Teneurs maximales autorisées dans les aliments pour bétail en Europe en 2006 (d'après la Recommandation de la commission du 17 août 2006).

Mycotoxines	Réglementation européenne 2006 : quantité maximale autorisée dans les aliments pour bétail (µg/kg)
AFB1	5-20
OTA	50-250
ZEA	100-3000
DON	900-12000
FB1+FB2	5000-60000

Tableau 7 : Quantité maximale autorisée dans les denrées alimentaires destinées à l'homme en Europe en 2006 (d'après le règlement CE n°1881/2006).

Mycotoxines	Réglementation européenne en 2006 : quantité maximale autorisée dans denrées alimentaires destinées à l'homme (µg/kg)
AFB1	0,025-15
OTA	0,5-10
ZEA	20-400
DON	200-1750
FB1+FB2	200-4000

III.3 Réglementation et économie

La réglementation doit aussi prendre en compte d'autres aspects politiques et économiques. La FAO (« Food and Agriculture Organisation ») estime qu'environ un quart des récoltes de la planète de produits alimentaires est susceptible d'être contaminé par les mycotoxines soit environ 1000 milions de tonnes par an. Il est très difficile d'évaluer de manière sûre la perte économique du aux mycotoxines (Wu, 2007). La FDA (« US Food and Drug Administration »), à partir d'un modèle, a évalué la perte aux Etats-Unis du aux aflatoxines, DON et fumonisines à 392 milions de dollars (CAST 2003). Plus la réglementation est stricte et plus la quantité de matières premières à

jeter sera importante. Cela peut créer de graves problèmes économiques aux pays exportateurs de produits agricoles, problèmes à évaluer et à comparer avec le risque mycotoxique.

Afin d'éviter une réglementation trop stricte, celle-ci est toujours en évaluation. Par exemple, la réglementation sur les aflatoxines dans les noix est considérée comme trop stricte à l'heure actuelle. De nombreuses études ont alors été effectuées pour évaluer le risque lié à une augmentation de seuil. Dans un avis adopté en janvier 2007, le groupe scientifique de l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) sur les contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM) a conclu que l'augmentation, pour les amandes, noisettes et pistaches, des taux maximum actuels autorisés d'aflatoxine totale dans l'UE de 4 µg/kg à 8 ou 10 µg/kg n'aurait que des effets mineurs sur l'exposition alimentaire estimée, le risque de cancer et la marge d'exposition calculée. En 2008, le *Codex Alimentarius* a défini un taux maximal d'aflatoxines totales de 10 µg/kg dans les amandes, noisettes et pistaches prêtes à la consommation, ce qui représente un taux supérieur à celui actuellement en vigueur dans l'UE (4 µg/kg d'aflatoxines totales). Actuellement, la Commission européenne et les États membres discutent de l'alignement de la législation de l'UE sur la décision du *Codex Alimentarius* pour ces noix.

Chapitre 2 : Méthodes de réduction du taux de mycotoxines dans les aliments

I Stratégie préventive : Contrôle du développement des moisissures

Des moisissures peuvent se développer sur les plantes pendant leur culture ou sur les produits agricoles pendant leur stockage, provoquant différentes maladies pouvant avoir des conséquences néfastes sur le consommateur. Ces moisissures ont, dans certains cas, la capacité de produire des mycotoxines. La première stratégie pour diminuer ce taux de mycotoxines est donc de limiter la prolifération des moisissures.

I.1 Pratiques recommandées au champ pour limiter la contamination fongique

L'agriculteur peut jouer sur de nombreux facteurs pour prévenir la contamination fongique.

D'abord, des pratiques culturales adaptées permettent de réduire les risques de contamination. Par exemple, la gestion des résidus de culture du précédent cultural (Barrier-Guillot *et al.*, 2007) est très importante pour éviter une contamination des futures cultures. La rotation culturale et le labour permettent également de limiter la contamination fongique (Munkvold, 2003 ; Champeil, 2004).

Ensuite, il est important d'adapter régulièrement ses pratiques aux conditions environnementales. Par exemple, la semaison des cultures doit s'effectuer dans une période ne contribuant pas au stress de la plante car cela favorise la prolifération des champignons. Des modèles d'aide pour les agriculteurs existent afin de prédire le risque mycotoxique en fonction des conditions environnementales du moment (Schaafsma et Hooker, 2007 ; Prandini *et al.*, 2009).

L'utilisation d'agents anti-fongiques peut aussi apporter une garantie complémentaire lorsqu'un risque prévisible existe (Paul *et al.*, 2008). Cependant, la gestion du risque mycotoxique ne peut s'effectuer sans prendre en compte d'autres risques alimentaires liés à la présence de ces fongicides. Une étude très récente a consisté en l'étude de la toxicité comparée de 2 fongicides et de la ZEA et le DON (Muri *et al.*, 2009). Cette étude a montré par un modèle de prédiction utilisant des données de toxicité chez les animaux et les hommes que le DON était plus toxique que la ZEA et les 2 fongicides.

Des variétés de plantes sélectionnées sur le critère de résistance aux moisissures (Clements *et al.*, 2004) peuvent être en priorité cultivées (Snijders, 2004). L'utilisation de maïs transgénique (Maïs Bt par exemple) pour diminuer le taux de contamination par les moisissures peut être envisagé notamment pour des pays où la contamination par les mycotoxines est un réel danger pour la santé publique (Wu, 2006).

La présence d'insectes ravageurs de culture, comme la pyrale, induisant des lésions dans les tiges et épis de maïs, favorise l'entrée des moisissures dans la plante (Sinha et Sinha, 1990). Il est donc important de limiter l'accès des produits agricoles à ces insectes.

Des techniques de biocontrôle avec d'autres microorganismes sont à l'étude pour lutter contre la fusariose (Schisler *et al.*, 2002). Dans ce contexte, l'agriculture biologique est souvent controversée pour une présence supposée de moisissures plus importante que dans l'agriculture conventionnelle. Or, l'ajout pesticides ne semble pas influer sur le taux de mycotoxines (Champeil *et al.*, 2004). Au contraire, de façon globale, certaines études montrent que l'agriculture conventionnelle comporte plus de risques mycotoxiques que l'agriculture biologique (Finamore *et al.*, 2004 ; Schneweis *et al.*, 2005).

I.2 Pratiques de stockage

Plusieurs facteurs importants peuvent être maîtrisés pour éviter une contamination fongique durant le stockage.

D'abord, l'intégrité physique des grains stockés doit être préservée. Un mélange de grains et/ou un temps de stockage long doivent être évités pour diminuer la contamination fongique.

Le contrôle des conditions de stockage (séchage, contrôle de la température, humidité, oxygénation des silos…) est très important afin d'éviter la prolifération de microorganismes indésirables (cf Figure 15) et l'éventuelle production de mycotoxines (Schrödter, 2004). Par exemple, pendant le stockage dans des silos, une concentration faible en O_2 (<1%) et une augmentation du taux de CO_2 sont efficaces pour prévenir le développement des moisissures (Driehuis et Oude-Elferink, 2000).

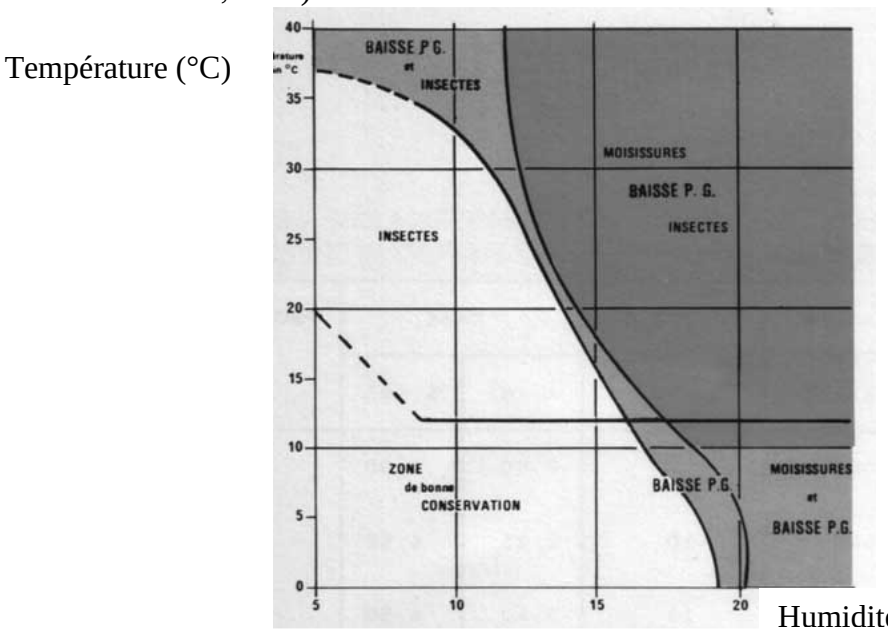


Figure 15 : Diagramme de conservation des céréales en fonction de la température et de l'humidité (d'après Burges et Burrel, 1964). P.G : Pouvoir Germinatif.

Un tri peut être effectué pour éliminer les grains contaminés. Ils n'ont ni la même forme, ni la même couleur, ni la même densité que les grains sains. Les grains peuvent alors être triés selon leur apparence (tri simple) ou selon leur densité (ségrégation par le poids) (Murphy *et al.*, 1993 ; Guerre, 2000 ; Afolabi *et al.*, 2006 ; Kabak *et al.*, 2006). Ces méthodes ne sont pas très spécifiques (perte de matière) et, en général, incomplètes. Lorsque la contamination en mycotoxines est hétérogène, l'élimination de la partie contaminée permet de réduire le taux de mycotoxines dans le produit fini (Benett *et al.*, 1978 ; Osborne *et al.*, 1996). Par exemple, l'épluchage des pommes avant fabrication de jus de pommes permet de réduire le taux de patuline de 95% (Lovett *et al.*, 1975).

Un lavage à l'eau de l'aliment ou du grain permet également une élimination de certaines mycotoxines mais de manière incomplète. Par exemple, la première étape du procédé de fabrication de spaghetti à partir de blé dur est un lavage à l'eau du blé, permettant d'éliminer 23% de la teneur en DON (Visconti *et al.*, 2004).

II Elimination des mycotoxines présentes dans les aliments

II.1 Généralités

Le suivi des pratiques préventives ne suffit cependant pas à éliminer totalement les risques de contamination. Il faut donc également élaborer des stratégies pour décontaminer les matières premières. La réduction du taux de mycotoxines peut s'effectuer pendant le procédé de fabrication de l'aliment (Bullerman et Bianchini, 2007) ou par ajout d'additifs dans l'aliment qui éliminent ou désactivent les mycotoxines dans l'organisme. Dans tous les cas, le procédé de décontamination doit détruire ou inactiver la toxine, ne doit pas générer de résidus toxiques, doit maintenir la qualité nutritive de l'aliment et ne doit pas modifier les propriétés technologiques du produit.

II.2 Diminution de la biodisponibilité des mycotoxines par adsorption

II.2.1 Principe du piégeage des mycotoxines

Une technique qui permet de diminuer le taux de mycotoxines dans un aliment consiste en piéger les mycotoxines pour diminuer leur biodisponibilité lors de la digestion dans le tractus intestinal. Certaines mycotoxines ont la capacité de s'adsorber sur des matériaux. Les propriétés de l'adsorbant et des mycotoxines jouent un très grand rôle dans leur capacité à s'adsorber entre eux. En effet, la structure physique de l'adsorbant soit la charge totale et sa distribution, la taille des pores et l'accessibilité de la surface ont une importance primordiale dans l'efficacité de l'adsorption. Les caractéristiques des mycotoxines telles que leur polarité, leur solubilité, leur taille, leur forme et, dans le cas de composés ionisés, leur distribution de charge et leur constantes de dissociation sont également importantes.

L'ajout d'adsorbants dans la ration alimentaire d'animaux est la méthode la plus utilisée pour contrer l'effet néfaste des mycotoxines. Ces adsorbants ne sont efficaces que si le complexe formé est stable dans le système digestif afin que les mycotoxines ne se retrouvent que dans l'urine et les féces.

II.2.2 Adsorbants minéraux

II.2.2.1 Le charbon activé

Le charbon activé est un composé formé par pyrolyse de matériaux organiques. Il est très poreux. En milieu aqueux, il peut adsorber la plupart des mycotoxines. Le charbon activé a surtout été étudié pour adsorber l'AFB1, la ZEA le DON car ce sont les mycotoxines où peu d'alternatives efficaces existent. Les résultats de différentes études sont condensés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Adsorption de différentes mycotoxines par du charbon activé.

Mycotoxine	Remarques	Références
AFB1	*In vitro* : Capacité d'adsorption de 1mg AFB1/100 mg *In vivo* : 90% du poids corporel retrouvé après traitement	*In vitro* : Decker et Corby, 1980 *In vivo* : Edrington *et al.*, 1997
OTA	*In vitro* et *in vivo* : 80% de l'OTA adsorbée avec 6 mg de charbon pour 10 mL L'ajout de charbon activé ne permet pas de rétablir le poids corporel chez le poulet	*In vitro* et *in vivo* : Rotter *et al.*, 1989
ZEA	*In vitro* : 100% de la ZEA adsorbée De 43% à 84% de la ZEA est éliminée par ajout de charbon activé dans un modèle intestinal	*In vitro* : Sabater-Vilar *et al.*, 2007 ; Döll *et al.*, 2004 ; Avantaggiato *et al.*, 2003
FB1	*In vivo* : Le ratio sphinganine/shingosine n'est pas modifié chez le rat après ajout de charbon activé dans la ration	*In vivo* : Solfrizzo *et al.*, 2001a
DON	*In vitro* : De 70% à 90% de DON adsorbé 35.1 µmol de DON adsorbé/g de charbon	*In vitro* : Sabater-Vilar *et al.*, 2007 ; Döll *et al.*, 2004 Avantaggiato *et al.*, 2004
T-2, HT-2	*In vitro* et *in vivo* : 48 mg T-2 adsorbée/100 mg 50% de survie chez la souris ayant été nourrie avec de la nourriture contaminée alors que 90% de survie est retrouvée après ajout de charbon Pas d'effet chez les poulets : 20% de perte de poids corporel avec ou sans traitement	*In vitro* et *in vivo* : Fricke et Jorge, 1990 Edrington *et al.*, 1997

II.2.2.2 Les argiles (aluminosilicates, HSCAS, zéolithes)

L'argile est une roche sédimentaire, composée pour une large part de minéraux spécifiques, silicates (forme chimique commune $Si_2O_5^{2-}$), en général d'aluminium (aluminosilicates ou phyllosilicates). La montmorillonite et la bentonite (cf Figure 16.B) appartiennent à cette famille de minéraux. Les aluminosilicates de sodium calcium hydratés (HSCAS) ont la caractéristique de contenir des ions calcium et ses protons sont échangés contre des ions sodium. Les zéolithes sont des composés de tétrahedrons de $Si0_4$ et d'AlO_4 avec l'atome de métal au centre de chaque tétrahedron (cf Figure 16.A). Grâce à cette structure les zéolithes présentent une surface spécifique très importante de l'ordre de 1000 m² par gramme de zéolite.

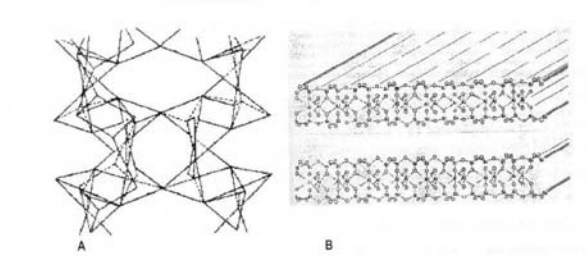


Figure 16 : Représentation schématique d'aluminosilicates : Les zéolithes (A) et les bentonites (B).

Ces différentes argiles peuvent être utilisées comme « éponge organique » pour adsorber les mycotoxines dans le tractus intestinal, avec une efficacité variable.

Du fait de l'interchangeabilité des cations positionnés sur les différentes couches, les montmorillonites et bentonites semblent efficaces contre l'AFB1, l'OTA (cf Tableau 9).

Les HSCAS ont une bonne affinité pour l'AFB1 (cf Tableau 10), formant un complexe stable aux pH compris entre 2 et 10 et sont également efficaces *in vivo*. En général, les HSCAS ont une plus faible affinité pour les autres mycotoxines (ZEA, OTA, trichothécènes).

Tableau 9 : Adsorption de différentes mycotoxines par des phyllosilicates.

Mycotoxine	Remarques	Références
AFB1	*In vitro* : Montmorillonite adorbe plus de 93% de l'AFB1 *In vivo* : L'ajout de bentonite permet de retrouver des paramètres cliniques normaux chez le porc	*In vitro* : Daković *et al.*, 2008 *In vivo* : Thieu *et al.*, 2008
OTA	*In vitro :* Bentonite, montmorillonite adsorbe l'OTA présente dans le vin entre 40% et 100%	*In vitro :* Kurtbay *et al.*, 2008
ZEA	*In vitro* : Montmorillonite adsorbe la ZEA par interactions hydrophobes *In vivo :* Poids d'utérus de rate augmente avec le traitement à la montmorillonite : effet oestrogénique plus important après traitement	*In vitro* : Lemke *et al.*, 1998 Lemke *et al.*, 2001a
T-2, HT-2	*In vivo* : 17% de perte de poids corporel avec toxine T-2 et seulement 9% après ajout de bentonite	*In vivo :* Carson et Smith, 1983
Multi-contamination AFB1-FB1	*In vitro et in vivo* : 9% de gain de poids chez le poulet après ajout de bentonite	*In vitro et in vivo* : Miazzo *et al.*, 2005

Tableau 10 : Adsorption de différentes mycotoxines par des HSCAS.

Mycotoxine	Remarques	Références
AFB1	*In vitro* : Plus de 80% d'AFB1 adsorbée *In vivo* : Ajout de HSCAS permet : - d'augmenter le poids corporel chez les cailles - d'anhilier les effets négatifs sur la progéniture de Drosophiles - une absence d'AFM1 dans l'urine de dinde - de réduire les effets négatifs de l'AFB1 chez le poulet	*In vitro* : Phillips *et al.*, 1988 *In vivo* : Sehu *et al.*, 2007 Sişman, 2006 Edrington *et al.*, 1996 Kubena *et al.*, 1990
OTA	*In vitro* : Pas d'effet	*In vitro* : Galvano *et al.*, 1998
ZEA	*In vivo* : Ajout de HSCAS diminue le taux d'aberrations chromosomiques chez la souris Effet positif sur la longueur de gestation chez le vison	*In vivo* : Abbès *et al.*, 2007 Bursian *et al.*, 1992
FB1	*In vitro* : 95% d'AFB1 et 85% de FB1 adsorbée	*In vitro* : Aly *et al.*, 2004
DON	*In vitro* : Pas d'effet Entre 5% et 8% de DON adsorbée	*In vitro* : Galvano *et al.*, 1998 Sabater-Vilar *et al.*, 2007
T-2, HT-2	*In vitro* et *in vivo* : Pas d'effet sur la toxicité de la toxine T-2	*In vitro* et *in vivo* : Kubena *et al.*, 1990

Les zéolithes sont une famille d'adsorbants minéraux possèdant des caractéristiques différentes et la capacité à adsorber différentes mycotoxines varie selon celles-ci (cf Tableau 11). Les zéolithes non modifiées sont utilisées pour adsorber l'AFB1 alors que les zéolithes hydrophobes sont plutôt utilisées pour l'OTA et la ZEA (Daković *et al.*, 2005).

Tableau 11 : Adsorption de différentes mycotoxines par des zéolithes.

Mycotoxine	Remarques	Références
AFB1	*In vitro* : Plutôt adsorbée sur des zéolithes non modifiées 100% de l'AFB1 adsorbée dans du liquide de rumen bovin *In vivo* : Apparence normale du foie chez le poulet L'ajout de clinoptilotite en présence d'AFB1 induit des lésions sévères : sûrement adsorption de composés importants dans la régulation de l'aflatoxicose	*In vitro* : Daković *et al.*, 2005 Spotti *et al.*, 2005 *In vivo* : Miazzo *et al.*, 2000 Mayura *et al.*, 1998
OTA	*In vitro* : Plutôt adsorbée sur des zéolithes hydrophobes (organozéolithes modifiées)	*In vitro* : Daković *et al.*, 2005
ZEA	*In vitro* : Zéolithe hydrophobe capable d'adsorber eniron 80% de la ZEA (interactions hydrophobes)	*In vitro* : Daković *et al.*, 2005, 2007

II.2.2.3 Autres adsorbants minéraux

Des polymères peuvent être utilisés : La cholestyramine est une résine échangeuse d'anions utilisée pour fixer les acides biliaires dans le tractus intestinal. Ce composé est capable d'adsorber la ZEA et la FB1 (cf Tableau 12). Ce composé semble être efficace *in vitro* et *in vivo.*

Tableau 12 : Adsorption de différentes mycotoxines par des polymères.

Mycotoxine	Remarques	Références
ZEA	*In vitro :* 90% de la ZEA adsorbée par la cholestyramine Entre 20% et 40% d'adsorption dans système digestif dynamique	*In vitro :* Döll *et al.*, 2004 Avantaggiato *et al.*, 2005
FB1	*In vitro :* Adsorption efficace dans système digestif dynamique *In vivo :* Cholestyramine réduit le rapport sphinganine/sphingosine chez le rat	*In vitro :* Avantaggiato *et al.*, 2005 *In vivo :* Solfrizzo *et al.*, 2001b
DON	*In vitro :* 5% de la DON adsorbée dans système digestif dynamique	*In vitro :* Avantaggiato *et al.*, 2005

Les acides humiques sont des substances organiques complexes, constituantes de l'humus, provenant de la décomposition des débris végétaux. Ces acides humiques ont la capacité d'adsorber les mycotoxines, notamment l'AFB1 (Jansen van Rensburg *et al.*, 2006) et la ZEA mais très peu le DON (Sabater-Vilar *et al.*, 2007).

Certains produits existent en tant qu'alliance de plusieurs produits efficaces. Par exemple, le produit Standard Q/FIS est une alliance de charbon et de HSCAS. Ces produits sont en général testés sur leur capacité à adsorber plusieurs mycotoxines en même temps (Avantaggiato *et al.*, 2007).

II.2.2.4 Limites des adsorbants minéraux

Les adsorbants minéraux sont en général efficaces pour adsorber l'AFB1 et éviter des aflatoxicoses mais l'efficacité varie contre les autres mycotoxines. De plus, dans certains cas, l'ajout d'argile augmente les effets de mycotoxicoses (Carson et Smith, 1983; Mayura *et al.*, 1998 ; Lemke *et al.*, 2001a). Par ailleurs, ces adorbants ne sont pas spécifiques des mycotoxines et ils peuvent adsorber tous types de molécules de mêmes caractéristiques physico-chimiques, celles-ci étant parfois indispensables pour l'animal ou pouvant être impliquées dans la lutte contre les mycotoxicoses (Mayura *et al.*, 1998).

D'un point de vue environnemental, on peut se demander si ces ligands sont biodégradables et s'ils peuvent altérer le fonctionnement des bassins de rétention et de traitement des effluents animaux.

II.2.3 Adsorbants biologiques

Les limites des adsorbants minéraux ont poussé les scientifiques à se tourner vers d'autres méthodes. De nombreuses études se sont portées ces dernières années sur les adsorbants de nature biologique, cherchant à obtenir une bonne efficacité et une meilleure spécificité d'adsorption tout en diminuant l'impact sur la qualité nutritionnelle des aliments par rapport aux adsorbants minéraux.

II.2.3.1 Les levures ou produits dérivés de levure

Des souches entières de levures, *Saccharomyces cerevisiae* ou d'autres types de levures œnologiques ont la capacité à adsorber les mycotoxines avec une efficacité très variable. Les

éléments responsables de cette adsorption, des glucomannanes extraits de parois de levures, ont été testés séparément *in vitro* et *in vivo*. Les résultats de diférentes études sont condensés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Adsorption de différentes mycotoxines par des levures ou produits dérivés de levure.

Souches de levures	Mycotoxine	Remarques	Références
S. cerevisiae Parois de levure enrichies en glucomannanes	AFB1	*In vitro* : 40% de l'AFB1 adsorbée *In vivo* : Baisse des effets génotoxiques de l'AFB1 après ajout de *S. cerevisiae* chez le rat *In vitro* : Très efficace (A[1]=97%)	*In vitro* : Shetty *et al.*, 2006, 2007 *In vivo* : Madrigan-Santillan *et al.*, 2006 *In vitro* : Yiannikouris, 2004
S. cerevisiae Levures œnologiques MTB-100	OTA	*In vitro* : 45% d'OTA adsorbée Peu efficace (A=11%)	*In vitro* : Bejaoui *et al.*, 2004 Cecchini *et al.*, 2006 Angioni *et al.*, 2007 Yiannikouris, 2004
MTB-100 Glucanes modifiées de levures	ZEA	*In vitro* : Efficace (A=48%) Extraits de parois de levure adsorbent entre 15% et 50% de la ZEA	*In vitro* : Yiannikouris, 2004 *In vitro* : Yiannikouris *et al.*, 2004a
MTB-100	FB1	*In vitro* : Entre 8 et 30% d'adsorption de la FB1	*In vitro* : Yiannikouris, 2004
MTB-100	DON	*In vitro* : Efficace (A=41%)	*In vitro* : Yiannikouris, 2004
Glucanes modifiées de levures	T-2, HT-2	*In vitro*: 183 mg adsorbée/g d'adsorbant	*In vitro*: Freimund *et al.*, 2003
Extrait de levure enrichi en glucomannanes	Multi-contamination ZEA/DON	*In vivo* : Disfonctionnements liés aux mycotoxines (biochimiques et immunologiques) annihilés chez le porc	*In vivo* : Swamy *et al.*, 2002
Glucomannanes estérifiés	Multi-contamination AFB1/ ZEA /OTA/toxine T-2	*In vivo* : La consommation de nourriture contaminée induit une baisse de 9,5% de poids corporel chez le poulet alors que l'ajout de glucomannanes augmente le poids de 8,8%	*In vivo* : Aravind *et al.*, 2003
Glucomannanes estérifiés	Multi-contamination AFB1/ZEA/FB 1/toxine T-2	*In vivo* : Réduction de 2,2% de la perte de poids chez le poulet	*In vivo* : Raju et Devegowda, 2000 Karaman *et al.*, 2005
Glucomannanes	Multi-contamination ZEA/FB1/ toxine T-2	*In vivo* : Augmentation du poids corporel et rétablissement des paramètres biochimiques chez le cheval	*In vivo* : Raymond *et al.*, 2003

[1]A : Affinité de la mycotoxine pour l'adsorbant calculée par le modèle de Hill

II.2.3.1 Les bactéries lactiques

Certaines souches de bactéries lactiques, de propionibactéries et de bifidobactéries possèdent des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines (cf Tableau 14). L'efficacité d'adsorption dépend beaucoup des souches étudiées (Peltonen *et al.,* 2001). L'adsorption entre les mycotoxines et les bactéries lactiques semble être du à des polycarbonates, provoquant des liaisons hydrophobes (Haskard *et al.*, 2000 et El-Nezami *et al.*, 2004).

Tableau 14 : Adsorption de différentes mycotoxines par des bactéries lactiques.

Souches de levures	Mycotoxine	Remarques	Références
L.rhamnosus *L. gasseri* *L. acidophilus* *L. amylovirus* *L.lactis* *B.lactis* *B. animalis* *B. longum* *B. bifidum* *B. adolescentis* *Propionibacterium freundenreichii* *L. casei* *L. plantarum* *L. fermentum*	AFB1	<u>*In vitro* :</u> Adsorption de 80% de l'AFB1 Adsorption réversible Adsorption de 60% de l'AFM1 Inactivation à l'acide ou à la chaleur augmente l'efficacité d'adsorption Adsorption de 40 à 70% de l'AFB1 par des bactéries vivantes ou mortes Adsorption réversible	<u>*In vitro* :</u> Haskard *et al.,* 2001 Pierides *et al.,* 2000 El-Nezami *et al.*, 1998, 2002 Pierides *et al.,* 2000 Bueno *et al.*, 2007 Peltonen *et al.,* 2001 El Nezami *et al.,* 2000 Fazeli *et al.*, 2009
L. acidophilus *B. animalis* *Oenococcus oeni*	OTA	<u>*In vitro :*</u> Adsorption de 95% Baisse de toxicité de 59% par analyse de micronoyaux sur cellules hépatiques humaines 28% d'OTA adsorbée	<u>*In vitro :*</u> Fuchs *et al.*, 2008 Del Prete *et al.*, 2007
L.rhamnosus	ZEA	<u>*In vitro* :</u> Adsorption de 55% De pH 4 à pH 8 Inactivation à l'acide ou à la chaleur (76% d'adsorption) augmente l'efficacité d'adsorption par rapport aux bactéries viables (47%)	<u>*In vitro* :</u> El-Nezami *et al.*, 2002 Niderkorn *et al.*, 2006 El-Nezami *et al.*, 1998, 2002
L.rhamnosus	FB1	<u>*In vitro* :</u> Entre 0 et 24% d'adsorption selon le pH et la souche	<u>*In vitro* :</u> Niderkorn *et al.*, 2006
L.rhamnosus	DON	<u>*In vitro* :</u> Entre 6% et 16% d'adsorption selon le pH et la souche	<u>*In vitro* :</u> Niderkorn *et al.*, 2006
Glucanes modifiées de levures	T-2, HT-2	<u>*In vitro*:</u> Entre 3% et 97% d'adsorption selon les souches	<u>*In vitro*:</u> Freimund *et al.*, 2003
L. acidophilus *B. animalis*	PAT	<u>*In vitro :*</u> Baisse de toxicité de 39% par analyse de micronoyaux sur cellules hépatiques humaines	<u>*In vitro :*</u> Fuchs *et al.*, 2008

II.2.3.2 Autres matériaux biologiques

Les spores de champignons sont également capables d'adsorber les mycotoxines. Il a été suggéré de les utiliser comme décontaminant de l'OTA présente dans le vin (Bejaoui *et al.*, 2005).

L'utilisation de fibres végétales insolubles a aussi été envisagée pour adsorber les mycotoxines présentes dans des aliments et en particulier l'OTA (Tangni *et al.*, 2006).

II.2.4 Synthèse sur l'efficacité d'adsorption des différentes mycotoxines

De nombreuses solutions existent pour piéger les mycotoxines par adsorption (cf Tableau 15). L'AFB1 peut être facilement adsorbable par de nombreux matériaux, minéraux ou biologiques (charbon, HSCAS, phyllosilicates, parois de levure et bactéries lactiques). L'adsorption de l'OTA, de la ZEA et de la FB1 a beaucoup été étudiée pour les adsorbants biologiques car peu d'effets sont observés pour les adsorbants minéraux. Le DON et les toxines T-2 et HT-2 sont en général très peu adsorbables.

Tableau 15 : Efficacité des différentes catégories d'adsorbants selon les mycotoxines.

Mycotoxine	Adsorbants
AFB1	Charbon activé HSCAS Phyllosilicates Parois de levure Bactéries lactiques
OTA	Parois de levure Bactéries lactiques
ZEA	Charbon activé Parois de levure Bactéries lactiques
FB1	Cholestyramine HSCAS
DON	Charbon activé Parois de levure
Toxine T-2	Charbon activé Parois de levure

Des modélisations mathématiques ont parfois été effectuées, conduisant à différents modèles, comme celui de Langmuir (1916) pour les adsorbants minéraux (Döll *et al.*, 2004) et de Hill (1979) pour les parois de levure (Yiannikouris *et al.*, 2003).

II.2.5 Stratégie de validation de l'efficacité d'un adsorbant

Pour valider l'efficacité d'un adsorbant, de nombreuses études doivent être effectuées (cf Figure 17). Il faut d'abord prouver que l'adsorbant a une forte capacité d'adsorption de ou des toxines concernées. L'adsorption doit être forte avec une désorption par lavage la plus faible possible. L'adsorbant doit être spécifique à la molécule que l'on veut adsorber. En effet, il est génant que certains nutriments et éléments essentiels soient également adsorbés. Il faut également vérifier que l'adsorbant seul n'est pas toxique. L'efficacité doit ensuite être prouvée *in vivo*. Enfin, en plus de l'efficacité technique, l'intérêt économique du produit doit aussi être évalué.

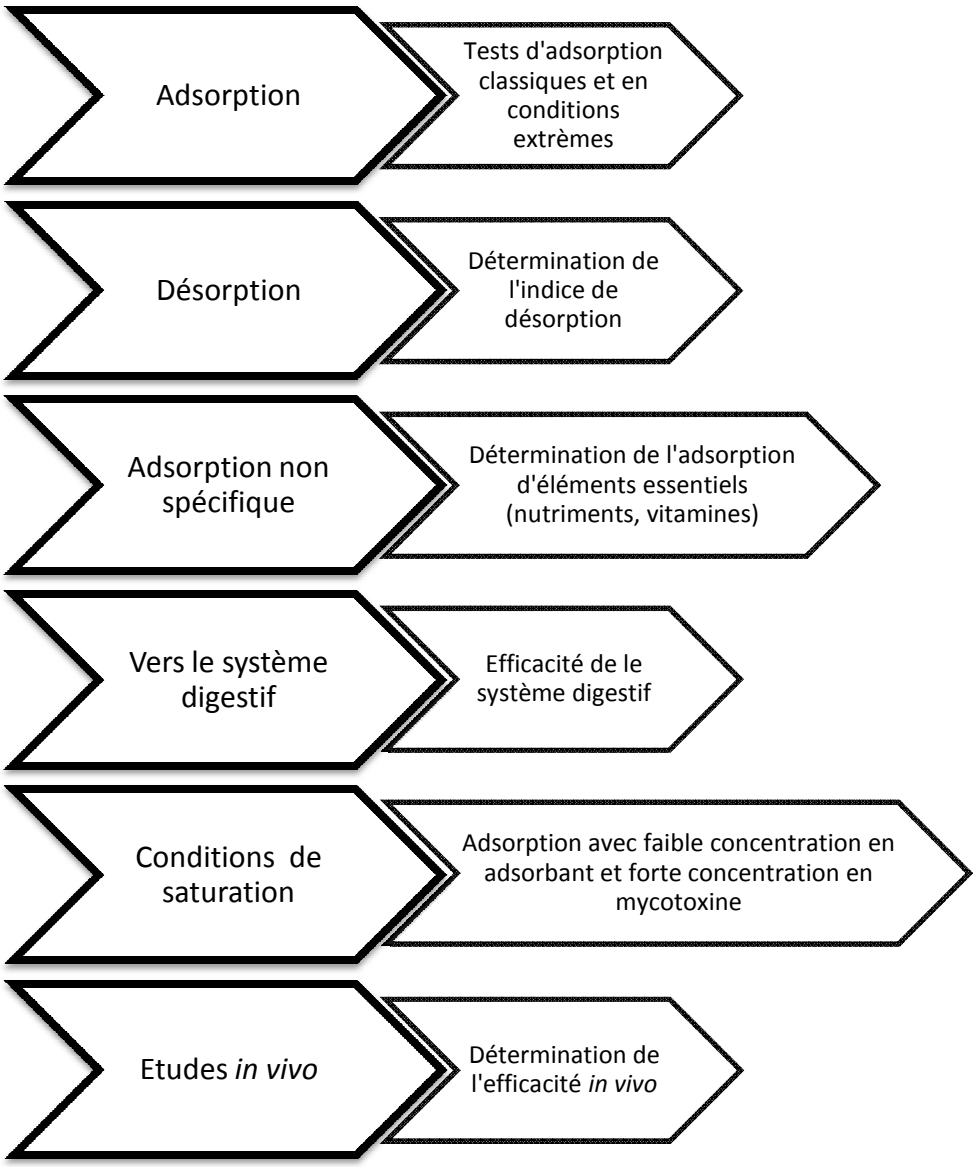


Figure 17 : Diagramme des différentes étapes nécessaires à une validation d'un adsorbant.

II.3 Transformation des mycotoxines

II.3.1 Transformation par des méthodes physico-chimiques

Peu de procédés physico-chimiques efficaces existent pour transformer les mycotoxines contaminant les matières premières en composés moins toxiques. Voici ci-après les procédés les plus étudiés.

II.3.1.1 Dégradation thermique par extrusion

Les mycotoxines sont en général très stables et peuvent être difficilement éliminées par traitement thermique. Cependant, la technique d'extrusion permet d'éliminer les aflatoxines, le DON, la ZEA et la FB1 dans le maïs (Cazzaniga *et al.*, 2001 ; Rustom, 1997 ; Voss *et al.*, 2008), tout en réduisant la charge microbienne de façon globale. Ceci implique un passage court de la denrée contaminée à plus de 150°C et entraîne des modifications moléculaires qui gélatinisent l'amidon, dénaturent les protéines et inhibent les activités enzymatiques.

II.3.1.2 Radiation

L'AFB1 est sensible aux ultraviolets, rayons x et rayons γ. Il est donc possible de diminuer le taux d'AFB1 par radiation (Rustom, 1997 ; Afifi *et al.*, 2003). Les radiations γ permettent également de réduire la flore microbienne.

II.3.1.3 Oxydo-réduction

Plusieurs agents oxydants (ozone, peroxyde d'hydrogène, eau oxygénée…) ont été utilisés pour détoxifier des aliments contenant des mycotoxines. Canadas (2006) a étudiée l'efficacité du procédé Oxygreen® utilisant l'ozone sur des céréales contaminées par de l'OTA. Les résultats de cette technique sont mitigés. Le procédé Oxygreen® permet d'obtenir un grain plus sain (moins de contaminations microbiologiques, moins de mycotoxines…) mais ne peut pas s'utiliser pour transformer du blé contaminé en blé sain, en raison d'effets secondaires, comme l'apparition d'adduits à l'ADN.

Le bisulfite de sodium est un agent réducteur qui permet de réduire le taux de mycotoxines (AFB1, DON) dans certains aliments (Kabak *et al.*, 2006).

II.3.1.4 Ammoniation

L'ammoniation du maïs, des arachides et autres matières premières est largement utilisée pour diminuer les teneurs en aflatoxines des aliments. C'est une méthode efficace de décontamination des nourritures animales, utilisée depuis plusieurs années (Park *et al.*, 1988). Elle est particulièrement efficace contre l'AFB1 lors de l'utilisation simultanée de hautes températures et de hautes pressions. Un des produits de dégradation observé pour ce procédé est l'AFD1 (cf Figure 18). Le problème de cette méthode est son inefficacité contre les autres mycotoxines, son coût et la possible détérioration de la qualité sanitaire de l'aliment par une quantité résiduelle d'ammoniac trop importante (Huwig *et al.*, 2001).

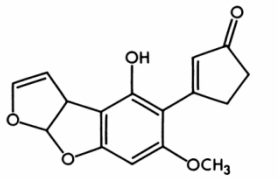


Figure 18 : Structure chimique de l'AFD1.

II.3.1.5 Dé-amination

L'ajout de $NaNO_2$ dans un milieu aqueux contaminé par de la FB1 permet de déaminer la FB1 (cf Figure 19) et réduire son caractère toxique (Lemke *et al.*, 2001b).

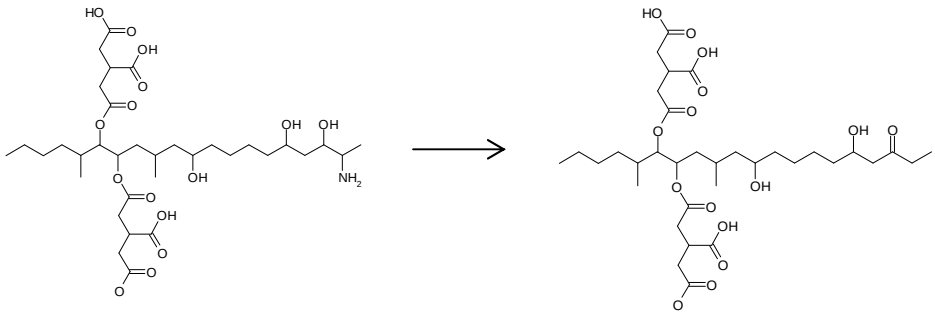


Figure 19 : Réaction chimique de déamination de la FB1.

II.3.2 Détoxication de mycotoxines par transformation

L'utilisation de procédés physico-chimiques est limitée par des coûts élevés, des pertes de qualité nutritionnelle des aliments, de sécurité, une faible efficacité, une faible spécificité et une forte

résistance des consommateurs aux méthodes chimiques. Ainsi, la recherche s'est tournée vers les procédés de transformation biologique de mycotoxines.

La détoxication biologique peut être définie comme une dégradation ou une transformation enzymatique des mycotoxines (par des microorganismes entiers ou des enzymes) en des composés moins toxiques.

Un nombre important d'organismes (bactéries, moisissures, champignons…) a montré une capacité à métaboliser des mycotoxines. Dans la suite du document, les différents moyens de biotransformer les mycotoxines seront présentés par type de mycotoxines.

II.3.2.1 La dégradation de l'aflatoxine B1

Quelques études ont été menées sur la dégradation de l'AFB1 par des microorganismes (cf Tableau 16).

Tableau 16 : Transformation de l'AFB1 par différents microorganismes.

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Bactéries			
Flavobacterium aurantiacum	Pas de produits observés	Capable d'éliminer les aflatoxines présentes dans le lait, l'huile végétale, le maïs, les cacahouètes Baisse d'inhibition de la bactérie Extrait brut métabolise l'AFB1	Ciegler *et al.*, 1966 ; Hao et Brackett, 1989 Lillehoj *et al.*, 1967 Smiley et Draughon, 2000
Stenotrophomonas maltophilia	Pas de produits observés	Isolée sur milieu comme seule source de carbone le coumarin (noyau de l'AFB1)	Guan *et al.*, 2008
Bacillus subtilis	Pas de produits observés	La fermentation de cette bactérie, incorporée dans l'aliment pour bétail permet de faciliter la croissance des animaux	Kubo, 1996 Petchkongkaew *et al.*, 2008
Actinomycètes			
Rhodococcus erythropolis	Pas de produits observés	Activité de dégradation due à des ezymes extracellulaires Produit moins toxique par test de Ames	Teniola *et al.*, 2005 Alberts *et al.*, 2006
Mycobacterium fluoranthenivorans	Pas de produits observés		Hormisch *et al.* (2004) Teniola *et al.* (2005).
Champignons macroscopiques			
Pleurotus ostreatus	Décroissance de fuorescence donc sûrement capable de cliver le cycle lactone.	Enzyme extracellulaire. Purification de l'enzyme.	Motomura *et al.*, 2003
Armillariella tabescens	Ouverture du cycle difurane probable		Liu *et al.*, 1998, 2001
Moisissures			
Rhizopus, Phoma, Trichoderma, Sporotrichum, Alternaria	Pas de produits observés		Shantha, 1999 Nakazato *et al.*, 1990

Ciegler *et al.* (1966) ont montré qu'une bactérie, *Flavobacterium aurantiacum* (également nommée *Nocardia corynebacteriodes*), est capable d'éliminer complètement cette mycotoxine. Des études ultérieures ont permis de prouver que la transformation ne conduit pas à un produit toxique (Lillehoj *et al.*, 1967) et qu'une enzyme intracellulaire est impliquée (Smiley et Draughon, 2000).

Peu d'études ont été menées jusqu'à l'identification de produits formés. Seules des suppositions ont été formulées concernant des enzymes d'*A. tabescens* qui ouvriraient le cycle difurane (Liu *et al.*, 1998), ou de *Pleurotus ostreatus* qui ouvriraient quant à elles le cycle lactone de l'AFB1 (cf Figure 20).

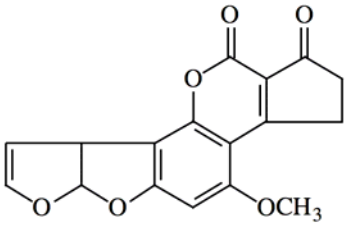


Figure 20 : Structure chimique de l'AFB1 avec son cylcle lactone et son cycle difurane.

II.3.2.2 La dégradation de l'ochratoxine A

De nombreux microorganismes tels que des bactéries, des moisissures, des levures et des plantes sont capables de transformer l'OTA en OTα, composé moins toxique (cf Figure 21 et Tableau 17). Les produits de dégradation n'ont cependant pas toujours été identifiés.

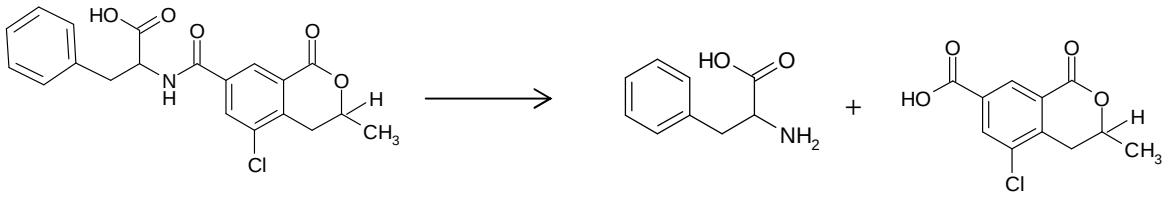


Figure 21 : Dégradation de l'OTA en phénylalanine et OTα.

La levure *Trichosporon mycotoxinivorans* est capable de dégrader l'OTA en OTα (Schatzmayr *et al.*, 2006) et fait partie du produit commercial Mycofix®plus (Biomin, Autriche).

La majorité des microorganismes qui ont la capacité de dégrader l'OTA en OTα utilise une carboxypeptidase (EC 3.4.17.1) capable de couper la liaison peptidique de l'OTA comme indiquée sur la Figure 21. D'autres enzymes capables de cliver l'OTA ont également été caractérisées (Stander *et al.*, 2000 ; Abrunhosa *et al.*, 2006).

Tableau 17 : Transformation de l'OTA par différents microorganismes.

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Bactéries			
Bactéries isolés à partir du rumen *Acinetobacter sp.*	OTα		Galtier et Alvinerie, 1976 Kiessling *et al.*, 1984 Hwang et Draughon, 1994
Phenylobacterium immobile	OTα		Wegst et Lingens, 1983
Bactéries lactiques	OTα		Skrinjar *et al.*, 1996
Moisissures			
Aspergillus de la section Nigri (*niger, japonicus, carbonarius*) *A.fumigatus*	OTα OTα	Plus de 80% de l'OTA dégradée	Abrunhosa *et al.*, 2002 Bejaoui *et al.*, 2006 Varga *et al.*, 2000
Rhyzopus sp.		95% de l'OTA dégradée en 7 jours	Varga *et al.*, 2005
Aureobasidium pullulans	OTα	Utilisée comme agent de biocontrôle efficace sur la vigne permettant une accumulation moindre de l'OTA dans le raisin et une diminution des symptômes de l'aspergillose	De Felice *et al.*, 2008
Penicillium			Abrunhosa *et al.*, 2002
Levures			
P. rhodozyma	OTα		Péteri *et al.*, 2007
Trichosporon mycotoxinivorans	OTα	Transformation totale en 2,5h Ajout de cette levure peut contrecarrer les effets nocifs liés à l'OTA chez le poulet	Molnar *et al.*, 2004 Schatzmayr *et al.*, 2002, 2003, 2006
Plantes			
Blé, maïs	Pas de produits observés		Ruhland *et al.*, 1996
P. ostreatus	Pas de produits observés		Engelhardt, 2002

II.3.2.3 La dégradation de la zéaralénone

Une variété de microorganismes comprenant des bactéries, de levures et des moisissures a montrée une capacité à transformer la ZEA (cf Tableau 18). Les métabolites produits sont représentés dans le Tableau 19.

Des composés hydroxylés et méthylés peuvent être formés (El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1987b) ainsi que des métabolites de la ZEA tels que la zéaralanone, l'α et β zéaralanol, l'α-zearalenol et β-zearalenol (McMullen, 1977 ; Kiessling *et al.*, 1984 ; Kamimura, 1986 ; Böswald *et al.*, 1995). Dans le cas de l'α-zéaralénol, cette transformation n'est pas une détoxication car ce composé a une activité oestrogénique supérieure à celle de la ZEA (Minervini *et al.*, 2005, Fitzpatrick *et al.*, 1989).

Des produits de conjugaison sont également observés tels que la ZEA-glucoside (El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1987a; Kamimura, 1986) et la ZEA-sulfate (El Sharkawy *et al.*, 1991; Plasencia et Mirocha, 1991).

D'autres produits de dégradation de la ZEA ont été observés comme un composé hydrolysé et décarboxylé et le gène correspondant a été transféré chez différents organismes (levure : Takahashi-Ando *et al.*, 2005 ; plantes : Kakeya *et al.*, 2002 ; Takahashi-Ando *et al.*, 2002 ; Igawa *et al.*, 2007). Récemment, Utermark et Karlovsky (2007) ont montré que la ZEA lactonohydrolase de *Clonostachys rosea* permet à ce champignon d'éviter l'inhibition de croissance qui apparaît sur d'autres champignons en croissance sur du milieu contaminé par la ZEA. Gromadzka *et al.* (2009)

montre aussi que ce champignon pourrait être utilisé comme agent de biocontrôle de la production de mycotoxines dans les céréales.

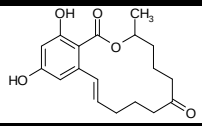
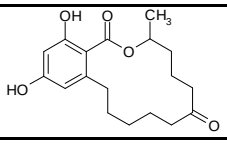
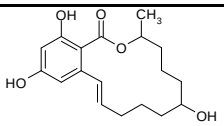
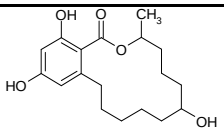
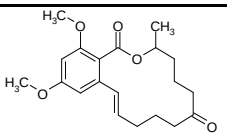
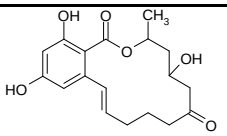
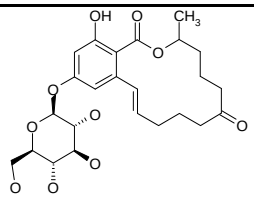
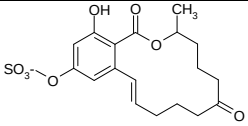
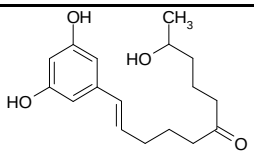
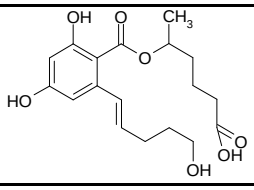
Enfin, des bactéries issues de sol de l'espèce *Pseudomonas* sont également capables d'éliminer la ZEA (El-deeb, 2004). Le produit n'a pas été identifié mais il est supposé moins toxique que la ZEA.

Tableau 18 : Transformation de la ZEA par différents microorganismes.

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Bactéries			
Bactéries du rumen	α- β zearalénol		Kiessling *et al.*, 1984
Bactéries intestinales de porc	Pas identifiés		Kollarczik *et al.*, 1994
Pseudomonas sp.	Pas identifiés	Produit moins toxique que la ZEA Enzyme codée par un plasmide	El-deeb, 2004 Altahli et El-Deeb, 2009
Culture mixte de bactéries issues du sol	Pas identifiés		Megharaj *et al.*, 1997
Moisissures			
Rhizopus sp.	ZEA-4-β-glucopyranoside + α- β zearalénol		Kamimura, 1986
Thamnidium elegans *Mucor bainieri*	ZEA-glucoside		Sharkawy et Abul-Hajj, 1987a
Cunnighamella bainieri	Méthoxy-ZEA		El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1987b
A. ochraceus *A. niger*	α- β zearalanol		El-Sharkawy et Abul-Hajj; 1987b
Penicillium rubrum *Aspergillus quadrilineatus* *Candida lypolytica* *Rhodoturola rubra* *Syncephalostrum elegans* *Chaetomium globosum*	α - β zearalénol		McMullen, 1977
Rhizopus sp.	ZEA-4-sulfate + α-zéaralénol	26% ZEA-sulfate 18% d'α-ZOL par rapport à ZEA initiale	El Sharkawy *et al.*, 1991
Fusarium sp.	ZEA-4-sulfate	Toxicité plus faible que la ZEA par mesure de la taille d'utérus de rate	Plasencia et Mirocha, 1991
Clonostachys rosea	ZEA-décarboxylée	Expression hétérologue du gène de lactonohydrolase *zhd-101*	El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1988 Takahashi-Ando *et al.*, 2002 Kakeya *et al.*, 2002 Igawa *et al.*, 2007

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Actinomycètes			
Streptomyces sp.	ZEA-glucoside Hydroxy-ZEA		Kamimura, 1986 El-Sharkawy et Abul-Hajj; 1987b
Rhodococcus sp. *Nocardia sp.*	ZEA-décarboxylée	Séquence protéique brevetée de la ZEA estérase pour insertion du gène dans plantes transgéniques	Duvick et Rood, 2000 Karlovsky *et al.*, 2003
Levures			
S. cerevisiae	zearalanone		El-Sharkawy et Abul-Hajj; 1987b
Candida tropicalis *Torulaspora delbrückii* *Zygosaccharomyces rouxii* *Saccharomyces sp.* *Pichia fermentans* *Candida sp.* *Hansenula sp.*, *Brettanomyces sp.*, *Schizosaccharomyces sp.* *Saccharomycopsis sp.*	α- β zearalénol α-zéaralénol		Böswald *et al.*, 1995
Trichosporon mycotoxinivorans	Hydroxy-ZEA	Présente dans le produit Mycofix®plus (Biomin, Autriche)	Molnar *et al.*, 2004 Schatzmayr *et al.*, 2008
Plantes			
Blé	ZEA-4-β-glucopyranoside		Schneweis *et al.*, 2002
Enzymes			
MDE		Origine non spécifiée	Cheng *et al.*, 2006

Tableau 19 : Structures chimiques de différents métabolites de la ZEA.

ZEA et ses métabolites	Structure chimique
ZEA	
Composé oxydé	
Zéaralanone	
Composés hydroxylés ou méthylés	
α- β zearalénol	
α- β zearalanol	
Méthoxy-ZEA	
Hydroxy-ZEA	
Glucuro ou sulfo-conjugués	
ZEA-4-β-glucopyranoside	
ZEA-4-sulfate	
Composés hydrolysés	
ZEA-décarboxylée	
ZEA-hydroxylée	

II.3.2.4 La dégradation de trichothécènes

La transformation des trichothécènes par les microorganismes a été mise en évidence dans les années 1960 (Zhou *et al.*, 2008). Le cycle 12,13-époxy du DON et de la toxine T-2 est l'élément

principal responsable de leur toxicité. Ainsi, en ouvrant ce cycle, soit en dé-époxydant la molécule, celle-ci devient moins toxique (Swanson *et al.*, 1988, Zhou *et al.*, 2008).

II.3.2.4.1 La dégradation du DON

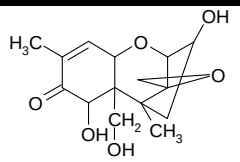
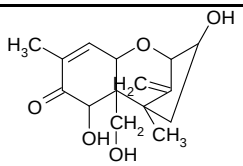
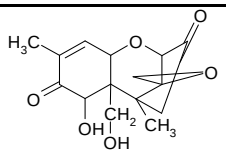
De nombreuses études rapportent une transformation par des cultures mixtes de microorganismes mais peu d'entre eux ont été identifiés (cf Tableau 20). Les 2 métabolites majeurs retrouvés sont la DON dé-époxydé et le 3-céto-DON, composés moins toxiques (Young *et al.*, 2007 ; Binder et Binder, 2004) (cf Tableau 21). La souche BBSH 797 d'*Eubacterium* fait partie du produit commercial Mycofix plus (Biomin) (Schatzmayr *et al.*, 2006).

Une enzyme appelée MDE (mycotoxin degrading enzyme), dont l'origine n'est pas spécifiée serait capable de dégrader le DON, mais également la ZEA (Cheng *et al.*, 2006).

Tableau 20 : Transformation du déoxynivalénol par différents microorganismes.

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Cultures mixtes de bactéries			
Bactéries intestinales de porc	DON dé-époxydé		Kollarczik *et al.*, 1994
Bactéries intestinales de poulet	DON dé-époxydé		Young *et al.*, 2007
Bactéries du rumen	DON dé-époxydé		Yoshiwa *et al.*, 1983 Côté *et al.* 1986 He *et al.*, 1992 Swanson *et al.*, 1987 King *et al.*, 1984
Bactéries de système digestif de poisson	DON dé-époxydé	100% de dégradation en 96h	Guan *et al.*, 2009
Culture mixte spontanée non identifiée			Völkl *et al.*, 2004
Bactéries isolées			
Eubacterium BBSH	DON dé-époxydé	Présente dans le produit Mycofix®plus (Biomin, Autriche)	Schatzmayr *et al.*, 2006
Eubacterium + *Enterococcus casseliflavus*	DON dé-époxydé		Binder et Binder, 2004
Agrobacterium-Rhizobium E 3-39	3-céto-4-DON	Activité immunosuppressive du produit plus faible que le DON	Shima *et al.*, 1997
Enzymes			
MDE		Origine non spécifiée	Cheng *et al.*, 2006

Tableau 21 : Structures chimiques de différents métabolites du DON.

DON et ses métabolites	Structure chimique
DON	
Composé dé-époxydé	
Composé cétone	

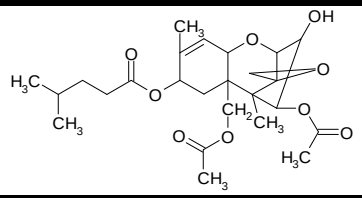
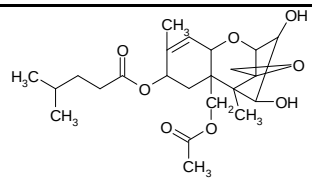
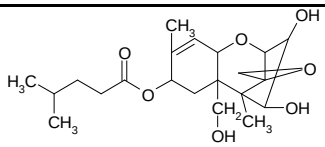
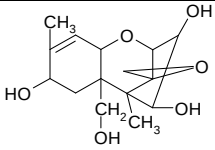
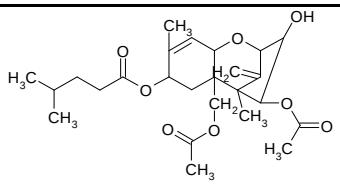
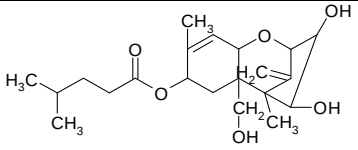
II.3.2.4.2 La dégradation de la toxine T-2

Peu d'études existent concernant la transformation des toxines T-2 et HT-2 (cf Tableau 22). Un métabolisme de la toxine T-2 a été élucidé par Swanson *et al.* (1988) et Beeton et Bull (1989), qui comprend plusieurs étapes : elle est d'abord transformée en toxine HT-2 par dé-acétylation. Une seconde dé-acétylation est observée pour transformer la toxine HT-2 en toxine T-2 triol, 20 fois moins toxiques que la toxine T-2 (Ueno *et al.*, 1983). Celle-ci est enfin transformée en T-2 tétraol. Les autres métabolites observés sont des dé-époxydes des métabolites cités précédemment (cf Tableau 23).

Tableau 22: Transformation de la toxine T-2 par différents microorganismes.

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Bactéries			
Eubacterium BBSH	Toxine HT-2	Pas une détoxication	Fuchs *et al.*, 2002
Curtobacterium sp.	T-2 triol		Ueno *et al.*, 1983
Bactéries isolées par enrichissement provenant du sol ou de l'eau	Toxine T-2 en HT-2 puis en T-2 triol et T-2 tétraol	Métabolisme de la toxine T-2	Beeton et Bull, 1989
Bactéries du rumen bovin	HT-2 T-2 triol Dé-époxy HT-2 Dé-époxy T-2 triol		Swanson *et al.*, 1987
Bactéries intestinales et du	Dé-époxy T-2 Dé-époxy HT-2 Dé-époxy T-2 triol	Dé-époxy T-2 400 fois moins toxique que la toxine T-2	Swanson *et al.*, 1988
Carboxyl estérase isolée à partir de foie de rat	T-2 en HT-2 puis en T-2 triol et T-2 tétraol		Johnsen *et al.*, 1986
Moisissures			
Alternaria sp., *Ulocladium sp.*, *Aspergillus candidus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhodotorula sp.*, *Aspergillus flavus* et *Cladosporium macrocarpum*	Pas de produits identifiés		Jesenska et Sajbidorova, 1991

Tableau 23 : Structures chimiques de différents métabolites de la toxine T-2 ou HT-2.

Toxine T-2 ou HT-2 et ses métabolites	Structure chimique
Toxine T2	
Molécules dé-acétylés	
Toxine HT-2	
Toxine T-2 triol	
Toxine T-2 tétraol	
Molécules dé-époxydées	
Toxine T-2 dé-époxydé	
Toxine T-2 triol dé-époxydé	

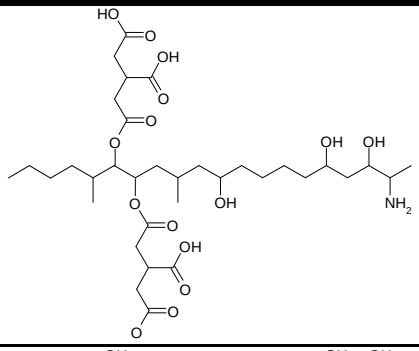
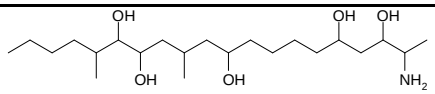
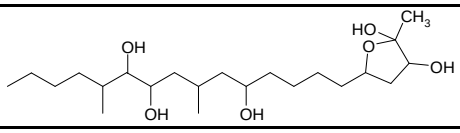
II.3.2.5 La dégradation de la fumonisine B1

La toxicité de la FB1 réside dans la présence de son amine primaire. La déamination de cette molécule réduit fortement sa toxicité. Très peu d'études ont été effectuées sur la dégradation biologique de la FB1 (cf Tableau 24). Le principal microorganisme capable de dégrader la FB1 est une levure noire, *Exophiala spinifera*. Les différents métabolites produits par cette levure sont présentés dans le Tableau 25. La transformation de la FB1 en AP1 se fait grâce à une enzyme extracellulaire, la carboxylestérase. Cette enzyme a été clonée et s'est montrée efficace dans des plants transgéniques de maïs devenus résistants à la fumonisine (Duvick *et al.*, 2003). D'autres enzymes sont également impliquées dans la dégradation de la fumonisine B1 (Blackwell *et al.*, 1994), et des produits de dégradation ont pu être caractérisés (Blackwell *et al.*,1999). Un brevet a été déposé en 2003 par Duvick *et al.*, 2003, portant sur l'utilisation d'estérases pour détoxifier la fumonisine.

Tableau 24: Transformation de la FB1 par différents microorganismes.

Souches utilisées	Produits observés	Remarques	Références
Levures			
Exophiala spinifera *Rhonacladiella atrovirens*	AP1 N-acétyl AP1 2-OP1	Carboxylestérase extracellulaire Enzyme clonée dans des plants de maïs transgéniques	Duvick *et al.*, 1998, 2001, 2003 Blackwell *et al.*, 1994, 1999
Bactéries			
Caulobacter sp.			Duvick *et al.*, 2003

Tableau 25 : Structures chimiques de différents métabolites de la FB1.

FB1 et ses métabolites	Structure chimique
FB1	
Polyol amine (AP1)	
2-OP1	

II.3.3 Stratégie de validation de l'efficacité d'un procédé de transformation

Pour qu'un procédé de transformation biologique d'une mycotoxine passe de la phase recherche à la phase commercialisation, de nombreuses études doivent être effectuées (cf Figure 22). Il faut d'abord prouver *in vitro* une forte capacité de dégradation de ou des toxines concernées. Tous les produits de transformation doivent être identifiés et leur toxicité doit être testée par différentes méthodes si possible. Les conditions nécessaires à l'utilisation des microorganismes pour la détoxication sont :

- Les produits de dégradation doivent être non toxiques
- La détoxication doit être rapide et les microorganismes doivent être actifs quelque soit la teneur en oxygène et à différentes valeurs de pH (surtout si elle s'effectue pendant la digestion de l'animal)
- Les microorganismes ne doivent pas être pathogènes
- Les microorganismes doivent être actifs dans un environnement complexe et ne pas être inhibés par les nutriments

L'efficacité doit ensuite être prouvée *in vivo*. Il peut être intéressant en parallèle de caractériser l'enzyme et de cloner son gène pour le surexprimer dans un plant transgénique. L'identification d'un potentiel de dégradation par un microorganisme est la première étape de développement du procédé.

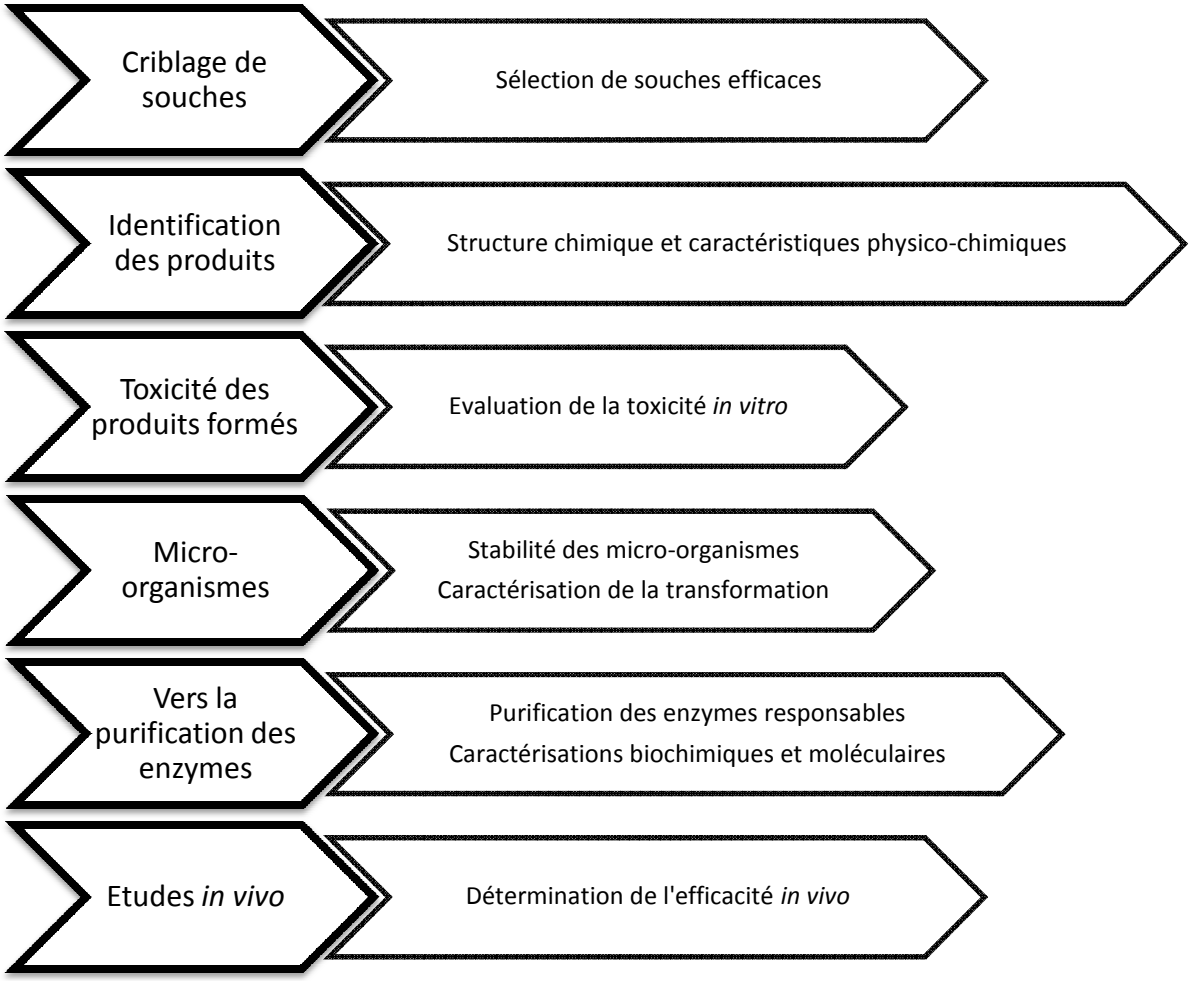


Figure 22 : Diagramme des différentes étapes nécessaires à une validation d'un procédé biologique de décontamination.

III Synthèse

Nous avons donc synthétisé l'état de l'art sur les mycotoxines en général (Etude bibliographique, Chapitre 1) puis sur la manière de piéger ou transformer les mycotoxines afin de réduire leurs effets néfastes sur la santé de l'animal (Etude bibliographique, Chapitre 2). Durant cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'adsorption de mycotoxines sur des spores d'*Aspergillus* de la section Nigri ou la transformation de la ZEA par des souches d'*Aspergillus* de la section Nigri. Dans la prochaine partie de ce document sont présentées les techniques employées pour réaliser cette étude.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I Matériel

I.1 Produits chimiques

Les mycotoxines utilisées (ZEA, OTA, FB1) ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier) ainsi que tous les produits chimiques de dosage (ortho-phthalaldehyde ou OPA, réactif de Bradford, 17-β-estradiol) et les acides et les bases utilisées. Les composants des milieux de culture et des tampons ont été commandés chez Fisher Scientific Bioblock (Illkirch). Les composés utilisés pour la culture des cellules MCF-7 ont été commandés chez Invitrogen (Cergy-Pontoise) sauf le kit CellTiter96®Aqueous pour doser les cellules vivantes (Promega, Charbonnières les bains). Les colonnes HPLC C18 ont été achetées chez ICS (Lapeyrouse-Fossat).

I.2 Milieux de culture

I.2.1 Milieux de culture pour les moisissures et actinomycètes

I.2.1.1 Czapeck Yeast Extract Agar (CYA)

La préparation du milieu CYA nécessite la préparation préalable des trois solutions A, B et Cu+Zn. Il est utilisé pour la culture des espèces d'*Aspergillus* de la section Nigri.

Composition pour 1 litre

Saccharose……..	30 g
Extrait de levure……..	5 g
Solution A……...…	50 mL
Solution C……...	50 mL
Solution Cu+Zn……..…..	1 mL
Agar…….	15 g
Eau distillée…….	qsp 1 L

Autoclaver 15 min à 121°C

Solution A

$NaNO_3$…….	40 g
KCl……..	10 g
$MgSO_4.7\ H_2O$……..	10 g
$FeSO_4.7\ H_2O$…….	0,2 g
Eau distillée……	qsp 1 L

Solution B

K_2HPO_4……...	20 g
Eau distillée……	qsp 1 L

Solution métallique Cu+Zn

$ZnSO_4, 7H_2O$……	10 g
$CuSO_4, 5H_2O$……	5 g
Eau distillée……	qsp 1 L

Le milieu Czapeck Yeast Broth ou CYB a la même composition que le CYA mais sans agar ce qui lui confère son état liquide.

I.2.1.2 International *Streptomyces* Project 2 (ISP_2)

Le milieu ISP2 a été spécialement conçu pour une bonne croissance des actinomycètes et spécifiquement des *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966). Le pH est ajusté à pH 7.

Composition pour 1 litre

Glucose……..	4 g
Extrait de levure……..	10 g
Extrait de malt……..…	4 g
Agar…….	15 g
Eau distillée…….	qsp 1L

I.2.2 Milieux de culture et lignée cellulaire MCF-7

Le milieu utilisé pour la culture de cellules MCF-7 est le milieu « Dubelcco's Modified Eagle Medium » (DMEM), composé d'ions minéraux, d'acide aminés, de vitamines et d'autres molécules indispensables à la croissance des cellules. Ce milieu est supplementé en glutamine (1% v/v), en solution antibiotique pénicilline, streptomycine pour éviter la contamination microbienne des cellules (1%), en SVF qui apporte les facteurs mitogènes nécessaires à la croissance des cellules (10%) et en insuline (0,1%), conseillé par le fournisseur de cellules. Les cellules ont été reçues au 152ème passage.

I.3 Microorganismes utilisés

Les différents microorganismes utilisés dans cette étude sont présentés dans le Tableau 26. Le code utilisé pour les isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri est le suivant: Les 2 premières lettres correspondent à la variété de raisin sur lequel la souche a été isolée (Syrah: A; Carignan: CA; Muscat: Mu; Grenache: G). Le chiffre suivant correspond au numéro de la parcelle (de 1 à 10 ou X). Les derniers nombres correspondent au numéro de l'isolat. Les souches d'*Aspergillus* de la section Nigri ont été isolées par Bejaoui *et al.*, 2006.

Tableau 26 : Souches fongiques et bactériennes utilisées.

Références des souches	Espèces	Lieu d'isolement
Moisissures		
MuX44	*A. niger*	Vigne
CA936	*A. niger*	Vigne
A138	*A. niger*	Vigne
GX312	*A. niger*	Vigne
Mu541	*A. japonicus*	Vigne
G221	*A. japonicus*	Vigne
AX35	*A. japonicus*	Vigne
CA223	*A. japonicus*	Vigne
Mu621	*A. carbonarius*	Vigne
Mu548	*A. carbonarius*	Vigne
Actinomycètes		
2	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
3	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
9	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
10	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
11	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
12	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
15	*Streptomyces sp.*	Sol saharien
16	*Streptomyces sp.*	Sol saharien

I.4 Adsorbants commerciaux utilisés

D'autres adsorbants que les spores ont été étudiés pour comparer l'efficacité de notre procédé à d'autres procédés commerciaux (cf Tableau 27).

Tableau 27 : Différents adsorbants utilisés et leurs fournisseurs associés.

Adsorbants commerciaux étudiés	Type d'adsorbants	Fournisseur
Mycosorb®	Parois de levure + glucomannanes	Alltech, Lexington, US
Carbovet®	Charbon activé	Pancosma, Bellegarde s/Valserine
Zéolithe A	Zéolithe hydrophile	Evialis, Vannes

II Méthodes

II.1 Préparation de l'inoculum et conservation des souches

Les souches, récupérées à partir de cryotubes de la souchothèque du laboratoire, sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant soit du milieu CYA pour les *Aspergillus* de la section Nigri soit du milieu ISP_2 pour les actinomycètes. Après 10 jours d'incubation à 25 °C, les spores sont raclées à l'aide d'une spatule stérile et resuspendues dans de l'eau stérile. La suspension de spores ainsi obtenue est dénombrée à l'aide d'une cellule de Thoma. Le stock de souche est effectué et conservé à -20°C sous forme de suspensions de spores (glycerol 50% - suspension de spores (50% v/v) dans des tubes cryogéniques de 1,8 mL.

II.2 Quantification des mycotoxines par HPLC

Les techniques HPLC mises en place ont été réalisées en s'inspirant des méthodes officielles de l'AFSSA et de l'AOAC lorsqu'elles étaient disponibles. Par ailleurs, aucune étape d'extraction n'a été employée puisque les mycotoxines étaient utilisées sous forme pure en suspension dans un tampon en milieu aqueux. Les analyses ont été effectuées en chromatographie phase-inverse avec des

colonnes C18. La détection utilisée était une détection fluorimétrique, plus sensible que la détection UV. Trois appareillages HPLC ont été utilisés: (i) un système ICS couplé à un détecteur UV associé à un fluorimètre (RF-10AXL, Shimadzu). L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel Normasoft ; (ii) un système ICS couplé à un détecteur UV/visible ainsi qu'un florimètre L7485 (Merck Hitachi) et le logiciel de traitement des chormatogrammes Normasoft (*iii)* un système Serlabo avec une barrète de diodes couplée à un fluorimètre FL3000 (Thermo Separation Product) et le logiciel Kroma 3000 pour l'analyse des acquisitions. Une chaîne HPLC à injection manuelle était dédiée au dosage de la FB1. En effet, la FB1 n'étant pas fluorescente, il faut la dérivatiser pour la détecter (cf Figure 23). La FB1 possède une fonction amine secondaire. C'est cette fonction qui interagit avec le réactif ortho-phtaldéhyde (OPA) et le β-mercapto-éthanol pour former une molécule complexe fluorescente. La FB1 a été dosée en mode isocratique. Selon les chaînes HPLC et les mycotoxines à doser, plusieurs méthodes ont été utilisées (cf Tableau 28).

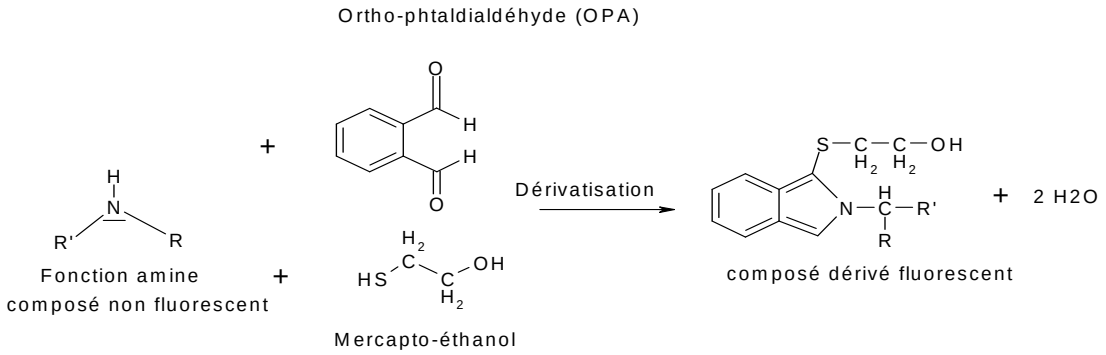


Figure 23: Réaction de dérivatisation de la FB1 par l'OPA.

Sur les 2 autres chaînes avec injecteur automatique, l'OTA et la ZEA ont été dosées. Pour la ZEA, 2 programmes on été utilisés selon les essais : une méthode courte pour une simple analyse des mycotoxines et une méthode longue en gradient pour éventuellement observer d'autres métabolites (cf Tableau 29). Par exemple, pour cette méthode longue, les temps de retention de la ZEA et de la ZEA-sulfate sont respectivement de 29 minutes et 11 minutes.

De l'eau ultrapure et des solvants de qualité HPLC (degré de pureté > à 99 %) ont été utilisés pour la réalisation des expériences. Les mycotoxines ont été achetées sous forme cristalline et ont été dissoutes dans du méthanol pour constituer la solution mère. Le système HPLC et la colonne étaient rincés à l'aide d'acétonitrile (ACN) ou de méthanol pur, sauf dans le cas du dosage des FB1 où un lavage préalable à l'eau destiné à éliminer les sels issus de la phase mobile précédait un lavage au méthanol. Un ajustement du pH (pH 3,3) doit être effectué pour la phase mobile utilisée pour le dosage de la FB1. L'ordre « eau » puis « méthanol » était respecté de manière stricte afin d'éviter toute recristallisation des sels pendant la phase de lavage.

Pour solubiliser les mycotoxines avant analyse HPLC, 0,6 mL de methanol a été ajouté à 0,4 mL de solution aqueuse.

Tableau 28 : Programmes et chaînes HPLC utilisées pendant l'étude.

	OTA			ZEA					FB1
Chaîne HPLC	Serlabo	ICS		Serlabo	ICS	ICS	Serlabo	ICS	ICS
Injecteur	Auto	Auto		Auto	Auto	Auto	Auto	Auto	Manuel
Détecteur fluo.	FL3000	RF-10AXL		FL3000	RF-10AXL	RF-10AXL	FL3000	RF-10AXL	L7485
Gradient	-	-	-	-	-	-	Oui	Oui	-
Phase A	MétOH[1]	ACN[2]	MétOH	MétOH	MétOH	ACN	MétOH	ACN	MétOH
Phase B	Acide ac.[3] (0,2%)	Acide ac. (0,2%)	Acide ac. (0,2%)	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	NaH_2PO_4 0,1M, pH 3,3
Ratio A/B	70/30	70/30	70/30	70/30	80/20	70/30	Initial : 30/70 Final : 90/10	Initial : 30/70 Final : 90/10	75/25
Débit (mL/min)	0,8	0,5		0,8	0,5		0,8	0,5	0,5
Temps analyse (min)	15	15		15	15	15	40	50	40
Temps de rétention (min)	7,2	7,2		8,5	11	7,5	29	35	27
λex (nm)	332			274					334
λem (nm)	466			450					440
V inj. (µL)	60	20		60	20		60	20	60
Colonne	Prontosil 120-5-C18-SH 5µm	Prontosil 120-30-C18-H 3µm		Prontosil 120-5-C18-SH 5µm	Prontosil 120-30-C18-H 3µm		Prontosil 120-5-C18-SH 5µm	Prontosil 120-30-C18-H 3µm	Prontosil 120-30-C18-H 3µm

[1] Méthanol
[2] Acétonitrile
[3] Acide acétique

Tableau 29 : Gradient utilisé pour l'analyse de la ZEA, méthode longue.

Temps d'analyse (min)	Pourcentage de méthanol ou d'ACN	Pourcentage d'eau ultrapure
0	30	70
5	30	70
30	90	10
35	90	10

II.3 Mesure de la capacité d'adsorption in vitro des mycotoxines

II.3.1 Adsorption des mycotoxines *in vitro dans du milieu simple tamponné*

II.3.1.1 Protocole d'adsorption

L'adsorption *in vitro* avec la ou les mycotoxine(s) a été menée comme présentée sur la Figure 24. Selon les essais, le type d'adsorbant, la concentration d'adsorbant étudiée et le temps de contact

sont différents (cf Tableau 30). La concentration de spores Mu541 de 10^7 sp/mL correspond à 12 µg/mL, estimée par mesure du poids sec. Cette concentration massique a été utilisée pour les autres types d'adsorbants.

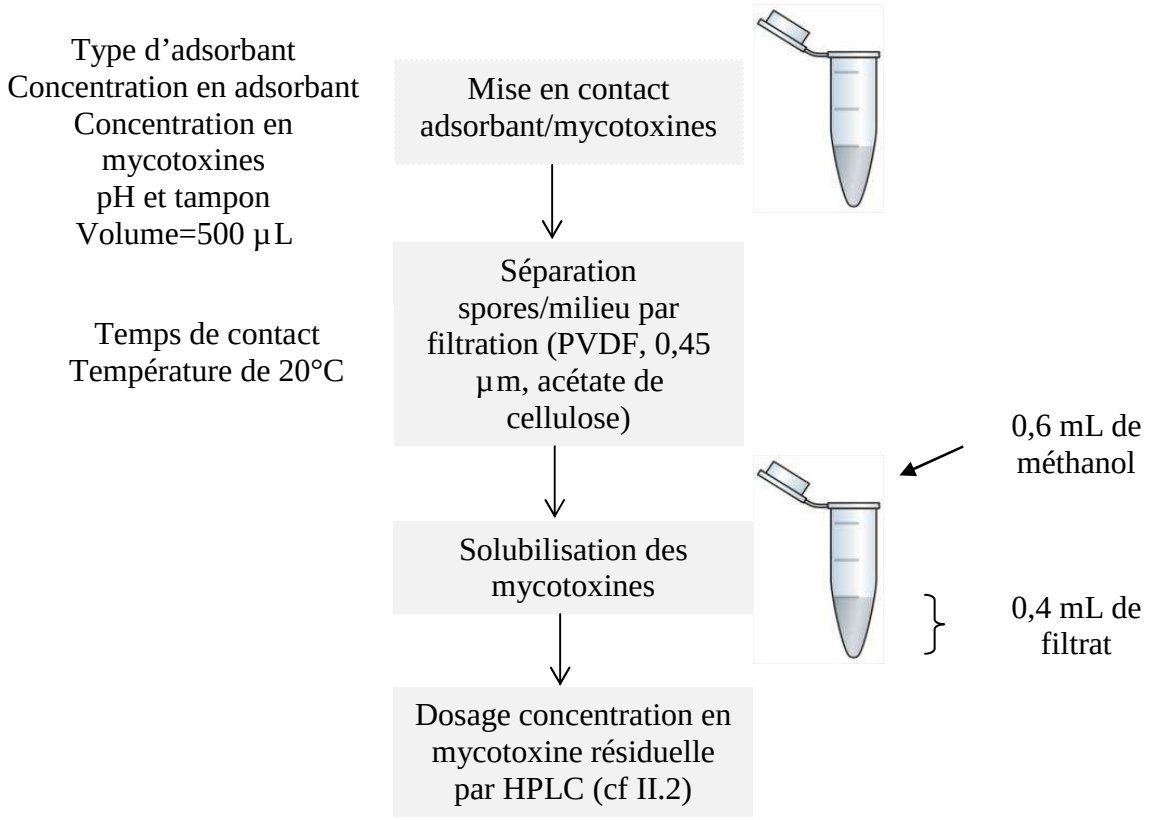


Figure 24 : Différentes étapes et paramètres associés pour les tests d'adsorption des mycotoxines.

Le pourcentage d'élimination des mycotoxines est alors calculé en comparaison avec un témoin négatif, milieu contaminé par les mycotoxines sans adsorbant (cf Équation 1).

Équation 1 : Calcul du pourcentage d'adsorption des mycotoxines.

$$\%_{\text{élimination}} = 100 \times (1 - \frac{[ZEA]_{essai}}{[ZEA]_{témoin}})$$

Pour de nombreux essais 2 pHs ont été choisis (pH 2,5 et pH 6) pour pouvoir évaluer l'efficacité dans un pH plutôt acide (conditions estomac) et un pH neutre (conditions intestin).

Tableau 30 : Conditions d'adsorption en fonction des différents essais effectués.

Essais	Ads.[1]	[Ads.]	M[2]	[M]	Temps de contact	Tampon[3]	pH
Criblage	Spores vivantes d'*Aspergillus* de la section Nigri	10^7 sp/mL	ZEA	1 µg/mL	5 ou 60 min	P-C 0,05M	6
Extraction de la ZEA adsorbée	Spores inactivées Mu541	10^7 sp/mL	ZEA	8 µg/mL	5 min	P-C 0,05M	6
Influence de la concentration en spores	Spores inactivées Mu541	10^6, 10^7, 10^8, 2.10^8 sp/mL	ZEA	1 µg/mL	5 min	P-C 0,05M	2,5 6
Influence du pH	Spores inactivées Mu541	10^7 sp/mL	ZEA	1 µg/mL	5 min	P-C B 0,05M	2-8 9-11
Influence du traitement à la chaleur	Spores traitées à la chaleur 120°C, 20 min ; 12°C, 60 min ; 130°C, 10 min ; 140°C, 5 min	5.10^7 sp/mL	ZEA	1 µg/mL	5 min	P-C 0,05M	6
Adsorption en milieu complexe (riche en nutriments)	Spores inactivées Mu541	10^7 sp/mL	ZEA	1 µg/mL	5 min	P-C 0,05M	6
Influence de la concentration en mycotoxines	Spores inactivées Mu541	10^7 sp/mL	ZEA OTA FB1	0,5-12 µg/mL	5 min	P-C 0,05M	2,5 6
Etude de l'éventuelle compétition entre les mycotoxines	Spores inactivées Mu541	10^7 sp/mL	ZEA+ OTA+ FB1	1-20 µmol/L	5 min	P-C 0,05M	2,5 6
Comparaison avec des adsorbants commerciaux	CarboVet® Mycosorb® Zéolithe A®	12 µg/mL	ZEA OTA	2-12 µg/mL	5 min	P-C 0,05M	2,5 6
Mime système digestif	Spores inactivées Mu541	10^8 sp/mL	ZEA	1 µg/mL	Cf II.3.1.1	P-C 0,05M	3-7

[1]Ads. : Adsorbant
[2]M : Mycotoxine
[3]P-C : Phosphate-citrate, B : Borate.

II.3.1.1 Protocole d'inactivation des spores

L'inactivation des spores par la chaleur a été effectuée par autoclavage des suspensions de spores à 120°C pendant 20 min sous pression (1,2 bars). D'autres conditions de températures et de durées ont été testées correspondant plutôt à un traitement de surface des spores puisque l'inactivation a déjà lieu pour des conditions moins drastiques. L'inactivation a été vérifiée par dénombrement de suspension par mesure des unités formant colonies (UFC) par mL sur du milieu CYA.

II.3.1.2 Protocole d'extraction de mycotoxine adsorbée

Pour prouver l'adsorption des mycotoxines sur les spores, le filtre contenant les spores sur lesquelles est adsorbée la mycotoxine est lavé à l'eau (1V) puis extrait au méthanol (1V). La quantité de mycotoxine résiduelle, non adsorbée, la quantité de mycotoxines désorbée par lavage à l'eau et la quantité de mycotoxine désorbée par extraction au méthanol sont dosées.

II.3.1.1 Protocole d'adsorption *in vitro* mimant les conditions d'un sytème digestif

L'efficacité de l'adsorption de la ZEA par des spores Mu541 a été testée dans un mime de système digestif *in vitro* (cf Figure 25) inspiré de Döll *et al.* (2004). Après mise en contact, les spores et la mycotoxines sont laissées 2 heures à 37°C. Le pH est ensuite ajusté à pH 3 par ajout d'HCl à 6M. Le mélange est ensuite incubé pendant 2 heures supplémentaires à 37°C. Après cette période d'incubation simulant les conditions dans l'estomac, le pH est ajusté à pH 6 par ajout de NaOH à 5M. Le mélange est encore incubé 2h à 37°C et le pH est ajusté à pH 7. Le mélange est incubé finalement 2 heures à 37°C. Les deux dernières étapes simulent les conditions dans l'intestin. 5 tubes sont préparés correspondant à chaque étape de protocole. Avant chaque changement de pH, un tube est retiré et les spores sont éliminées du milieu par filtration.

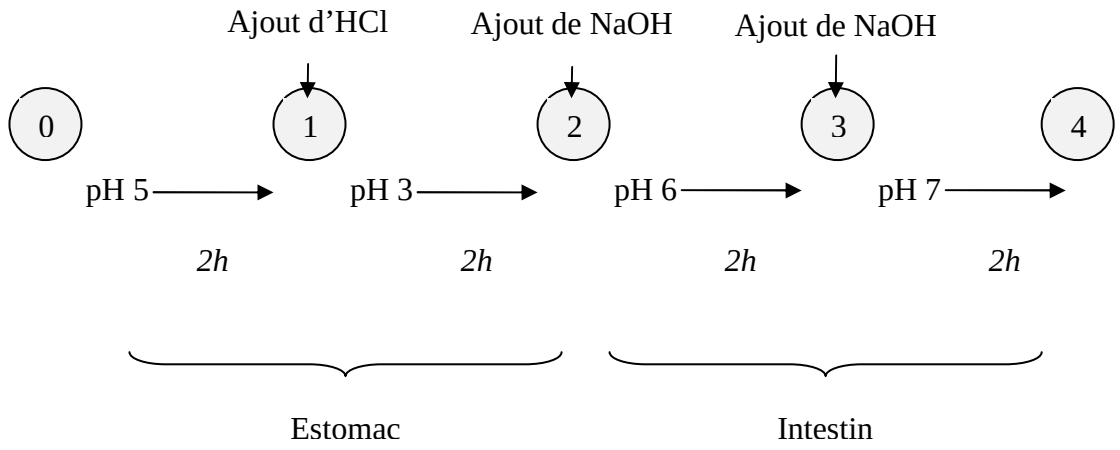


Figure 25 : Protocole utilisé pour mimer l'adsorption dans des conditions de pH, de température et de temps de séjour d'un système digestif de porc, inspiré de Döll *et al.*, 2004.

II.3.1.2 Evaluation des paramètres d'adsorption grâce à différents modèles

Pour évaluer les paramètres d'adsorption des mycotoxines sur les spores, plusieurs modèles (Hill, 1910 ; Freundlich, 1906; Langmuir, 1916) ont été testés grâce au logiciel DataFit 7.1 (Oakdale Engineering, Oakdale, Pennsylvania, USA). Pour l'adsorption de la ZEA sur les spores inactivées, le modèle de Hill (cf Équation 2) correspondait le mieux aux valeurs expérimentales. La modélisation a été effectuée avec des concentrations en mycotoxines variant de 0,5 à 12 µg/mL, et à 2 pHs différents (pH 2,5 et pH 6).

Équation 2 : Modèle de Hill (Hill, 1919)

$$ZEA_{ads} = \frac{ZEA_{ads}^{\max} \cdot (ZEA_{initial})^n}{KD + (ZEA_{initial})^n}$$

ZEA_{ads} : Quantité de zéaralénone adsorbée sur les spores (calculée par rapport aux témoins)
$ZEA_{initial}$: Quantité de zéaralénone ajoutée dans le milieu au départ.
$ZEA_{ads}^{\max}$: Quantité maximale de zéaralénone qui peut se fixer sur les spores
KD : constante d'association de la zéaralénone initialement ajoutée
n : nombre de sites de fixation

Les paramètres du modèle de Hill donnent des indices pour l'interprétation biologique du phénomène d'adsorption :
D'autres paramètres peuvent être définis comme :

- la constante d'association par site de fixation $Kd = \sqrt[n]{KD}$

- la constante de saturation Ksat soit la quantité minimum de zéaralénone qu'il faut ajouter dans le milieu pour atteindre la quantité de zéaralénone maximale ZEA_{ads}^{max}
- l'affinité $A = \frac{ZEA_{ads}^{max}}{2 \cdot Kd}$

Pour décrire le phénomène en entier, il faut prendre en compte les paramètres Kd, Ksat, ZEA_{ads}^{max} et *n*, dont les représentations graphiques sont présentées sur la Figure 26.
Plus le nombre de sites *n* est important, plus le phénomène est coopératif, c'est-à-dire que plus la ZEA se fixe, plus elle a tendance à se fixer. Pour un *n* égal à 1, le modèle est appelé isotherme d'adsorption.

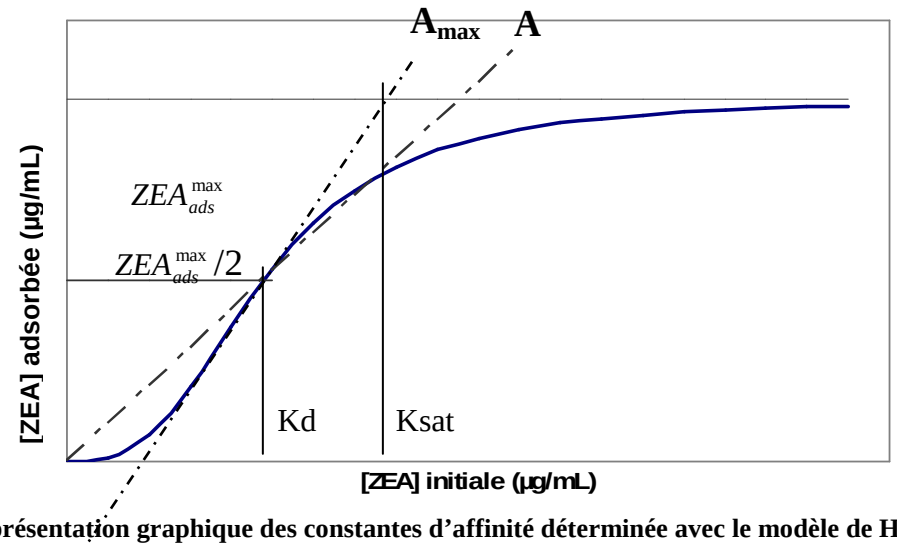


Figure 26: Représentation graphique des constantes d'affinité déterminée avec le modèle de Hill.

II.3.2 Essais d'adsorption *in vitro* des mycotoxines sur aliment naturellement contaminé

II.3.2.1 Dosage des mycotoxines dans la matrice alimentaire

Du maïs naturellement multi-contaminé en mycotoxines (cf Tableau 31) a été utilisé pour certains essais.

Tableau 31 : Niveau de contamination du maïs utilisé.

Mycotoxines présentes (Lot n° 17817)	Quantité dosée
ZEA	401 ppb
DON	3460 ppb
NIV	1860 ppb
FB1	4470 ppb
FB2	1190 ppb

Le dosage de la ZEA et la FB1 a été effectué pour les témoins (maïs seul) et les essais (maïs + adsorbants) grâce aux méthodes normalisées de Mac Donald *et al.* (2005) et la méthode normalisée européenne DS/DS/EN 14352 (2004).

La ZEA est extraite du maïs avec 100 mL de solvant d'extraction (eau/ACN ; 1 : 3) sous agitation pendant 3 minutes. L'extrait est séparé du maïs par filtration sur papier Whatman. 12 mL d'extrait sont ensuite prélevés et ajoutés à 88 mL de tampon phosphate salin (PBS) (8g de NaCl, 1,2g

de Na_2HPO4, 0,2g de KH_2PO_4, 0,2g de KCl dans 1L d'eau distillée). 50 mL d'extrait ainsi dilué sont passés sur une colonne d'immunoaffinité (ZéaraStar®, Biomin, Ploufragan) à 3 mL/min, au préalable conditionnée avec 20 mL de tampon PBS. Le débit est réglé par aspiration sous vide. La colonne est ensuite lavée avec 20 mL d'eau ultrapure. L'élution de la ZEA fixée sur les anticorps se fait grâce à 1,5 mL d'acétonitrile à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde. L'éluat est récupéré, filtré et séché à l'évaporateur sous vide (40°C, 40 minutes). L'éluat ainsi obtenu est resuspendu dans 500 µL de méthanol et injecté par HPLC.

Pour le dosage de la FB1, le mélange est mis sous agitation avec un mélange méthanol/ACN/eau (25/25/50) pendant 20 min. L'extrait est séparé du maïs par centrifugation (2500g, 10 min). Le culot est soumis à une 2ème extraction identique. Les 2 surnageants sont regroupés et passés sur colonne d'immunoaffinité Fumonistar® (Biomin, Ploufragan).

La quantité de mycotoxine (ZEA ou FB1) est alors calculée en µg/kg comme suit:

$$wZEA = \frac{C \cdot V_3 \cdot V_1}{V_2 \cdot m_S}$$

avec C : concentration en mycotoxine dosée dans l'éluat
V_3 : Volume de l'échantillon injecté : 0,5 mL
V_1 : Volume d'extrait au départ : 100 mL
V_2 : Volume d'échantillon utilisé pour la fixation : 6 mL
m_S : masse de maïs utilisée : 25g

II.3.2.2 Adsorption en conditions solide/solide

Le maïs naturellement contaminé dont la composition est présentée dans le Tableau 31, est mis en contact pendant 24h, à 30°C, sous agitation avec 100 mg ou 1g de spores de la souche *A. japonicus* Mu541 inactivées par autoclavage (120°C, 20 min). Sans séparation des spores de l'aliment, la mycotoxine est dosée dans le témoin (sans spores) et dans l'essai (avec spores) comme décrit précédemment dans la partie II.3.2.1.

II.3.2.3 Adsorption en conditions bol alimentaire

100 mg de spores Mu541 inactivées sont mis en contact avec le maïs naturellement contaminé dans 50 mL de tampon phosphate-citrate 0,05 M, pH 5. La séparation des spores du milieu étant impossible, le dosage a été efectué sur le mélange directement comme présenté dans la partie II.3.2.1.

II.4 Analyse physico-chimique de surface

II.4.1 Observation au microscope électronique à balayage

Un appareil de microscopie électronique à balayage (LEO 435 VP, métalliseur Edwards Pirani 501, Electron Microscopy Ltd, Cambrige, UK) a été utilisé pour observer la surface des spores. Deux grossisements ont été effectués (X 7000 et X 50000).

II.4.2 Analyse de la composition chimique de surface par spectroscopie par bombardement de la surface par rayons X (analyse ESCA ou XPS)

II.4.2.1 Principe

Un appareil de spectroscopie ESCA ou « electron spectroscopy for chemical analysis » (VG Escalab MKII, CIRIMAT) est utilisé pour déterminer la structure chimique globale d'une surface. Le

matériau est inséré dans une chambre sous vide, puis est irradié par des rayons X. Cela permet d'accéder à l'énergie de liaisons des électrons des atomes de la couche superficielle du matériau. En fonction de la vitesse des électrons libérés (soit de l'énergie nécessaire pour les arracher de leurs orbitales) par le bombardement des rayons X, il est possible de connaître la provenance de ces électrons (cf Figure 27). Un balayage a été effectué de 0 à 600 eV avec une mesure tous les 0.3 eV. Par exemple, pour l'appareil utilisé, les électrons issus des atomes de carbone ont une énergie entre 286 et 294 eV, les atomes d'azote entre 400 et 407 eV et les atomes d'oxygène entre 533 et 540 eV (cf Figure 28).

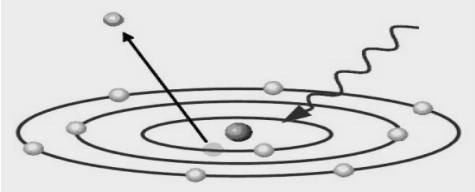


Figure 27 : Bombardement d'un atome par des rayons X.

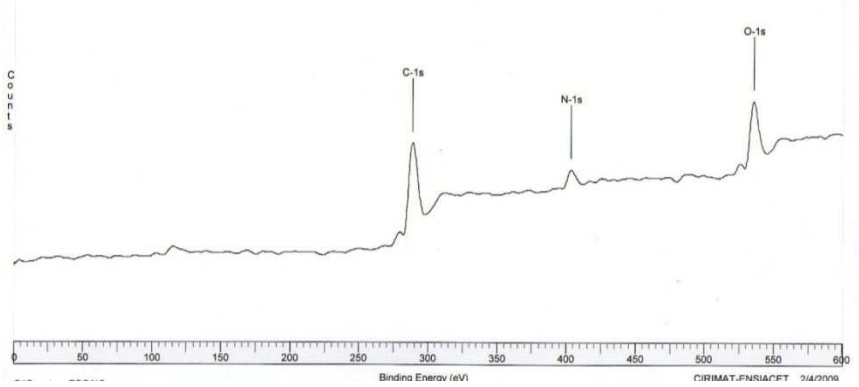


Figure 28 : Spectre d'énergie de liaison des électrons liés au carbone à l'azote et à l'oxygène.

II.4.2.2 Analyse des résultats

En fonction des liaisons entre les différents atomes, l'énergie de liaison des électrons est différente. C'est pourquoi, chaque pic correspondant à un atome est retraité et un calcul est effectué pour reformer le pic expérimental avec la somme de pics théoriques. Par exemple, durant l'analyse de la surface des spores, nous avons décomposé le pic de carbone en 4 sous-pics de façon à ce que les points calculés soient au plus près des points expérimentaux (cf Figure 29). Ces pics correspondent à des carbones composant des familles chimiques précises, identifiés grâce aux différences d'énergie de liaison (cf Annexe III). Les composés d'origine biologique sont essentiellement composés de carbone, oxygène, azote, hydrogène. Nous avons donc choisi de reconstituer le pic de carbone par 4 sous-pics : Le premier pic correspondrait à un carbone lié à un carbone ou à un hydrogène. Le 2ème pic correspondrait à un carbone lié à un azote ou à un oxygène. Le 3ème pic correspondrait à un carbone avec une double liaison avec un oxygène. Le 4ème pic correspondrait à un carbone lié à plusieurs oxygènes. Grâce à l'aire des pics, nous pouvons avoir accès au ratio atomique des carbones par rapport au carbone total.

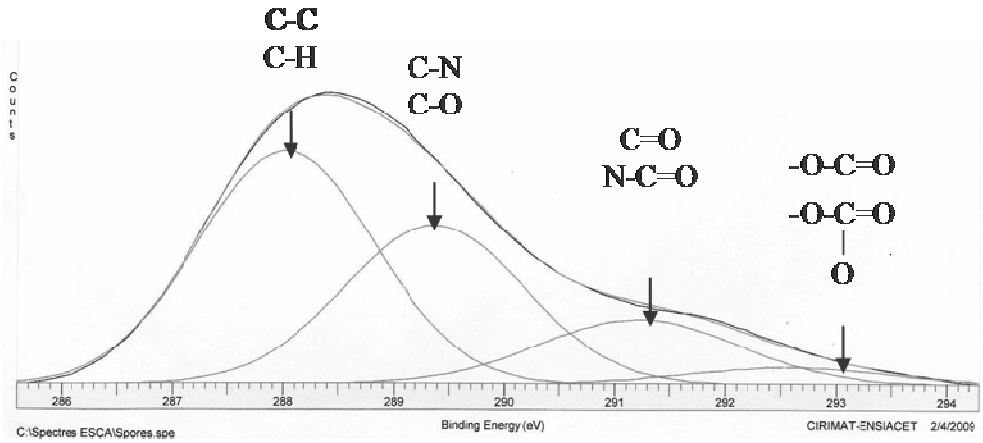


Figure 29: Spectre d'énergie de liaison des électrons liés au carbone. La courbe noire est le spectre obtenu expérimentalement. Les courbes rouges correspondent aux valeurs calculées correspondant à des carbones liés au carbone ou à des oxygènes. La courbe proche de la courbe expérimentale est la somme des courbes.

II.4.3 Mesure de l'hydrophobicité de surface

II.4.3.1 BATH Test (« Bacterial Adhesion To Hydrocarbons »)

Le BATH test permet d'estimer l'affinité d'un composé à une phase organique carbonée. Ce test est en général utilisé pour déterminer l'hydrophobicité de surface de bactéries. Ce test consiste en l'ajout de 1V d'hexane pour 1V de suspension de matériau (ici les spores de l'isolat Mu541). Le mélange est vortexé pendant 1 minute puis laissé reposer pendant 1h. Les spores de la phase aqueuse sont dénombrées sur cellules de Thoma et la concentration obtenue est comparée à la concentration initiale de la suspension. Le pourcentage de spores adhérées à la phase organique est calculé grâce à la concentration obtenue dans la phase aqueuse. Plus le pourcentage de spores dans la phase organique est important, plus le composé est dit hydrophobe.

II.4.3.2 Mesure d'angle de contact

Des mesures d'angle de contact (Digidrop, GBX, Romans sur Isère) permettent d'étudier l'hydrophobicité d'un matériau. Il s'agit de déposer une goutte d'eau sur une lame saupoudrée du matériau à tester (scotch double-face sur lequel est collé le matériau) et d'observer la forme de la goutte d'eau. L'angle entre la surface de la lame et l'extérieur de la goutte est mesuré. Plus l'angle est important, plus la surface est hydrophobe (cf Figure 30). A titre indicatif, une surface de verre (surface hydrophile) a un angle de contact d'environ 20° alors que du téflon (surface hydrophobe) a un angle de contact d'environ 95°.

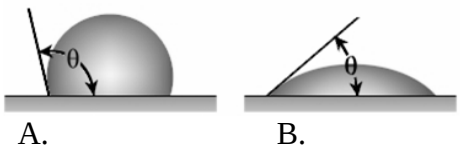


Figure 30 : Forme d'une goutte d'eau sur une surface hydrophobe (A.) et sur une surface hydrophile (B.).

II.4.4 Mesure du potentiel zéta

Autour de chaque particule en suspension, il y a adsorption d'ions. Le potentiel zéta d'une particule correspond à sa charge de surface. Le potentiel zéta d'une particule est mesuré par la

vitesse de déplacement de cette particule dans un champ électrique. Les particules en suspensions possédant un potential zéta vont migrer vers l'électrode de charge opposée à la charge de surface avec une vitesse proportionnelle à l'amplitude du potentiel zéta. Le principe détaillé est présenté dans l'Annexe IV. Ceci a été mesuré par un appareil Malvern instruments Ltd (Orsay).

II.5 Détoxication in vitro de la ZEA

La détoxication de la ZEA par différentes souches a été testée à plusieurs niveaux. En effet, sa métabolisation par du mycélium en croissance sur du milieu contaminé ainsi que des essais de transformation de la ZEA en cellules entières ou par des extraits bruts ont été menés (cf Figure 31).

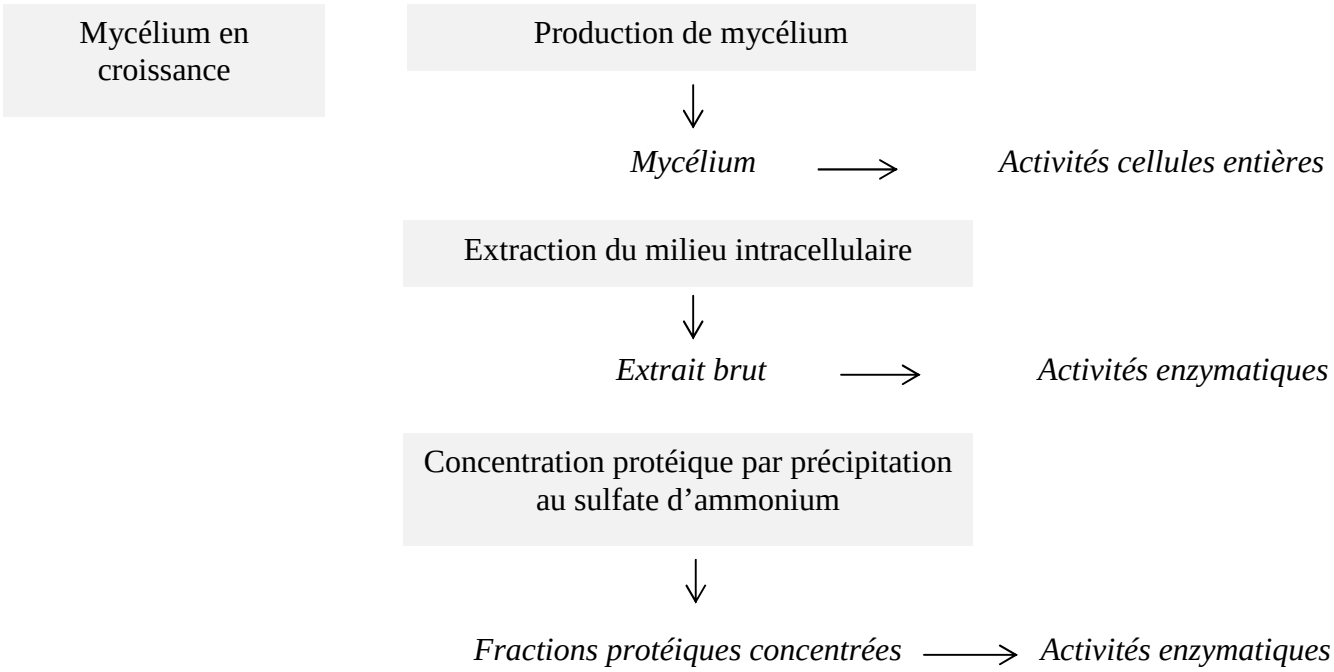


Figure 31 : Différentes étapes étudiées dans la détoxication de la ZEA.

II.5.1 Métabolisation de la ZEA par du mycélium en croissance

La détoxication de la ZEA *in vitro* a été menée comme présentée sur la Figure 32. Selon les essais, les souches, milieux de culture, volumes de culture, durées d'incubation et type d'ensemencement ont été différents (cf Tableau 32).

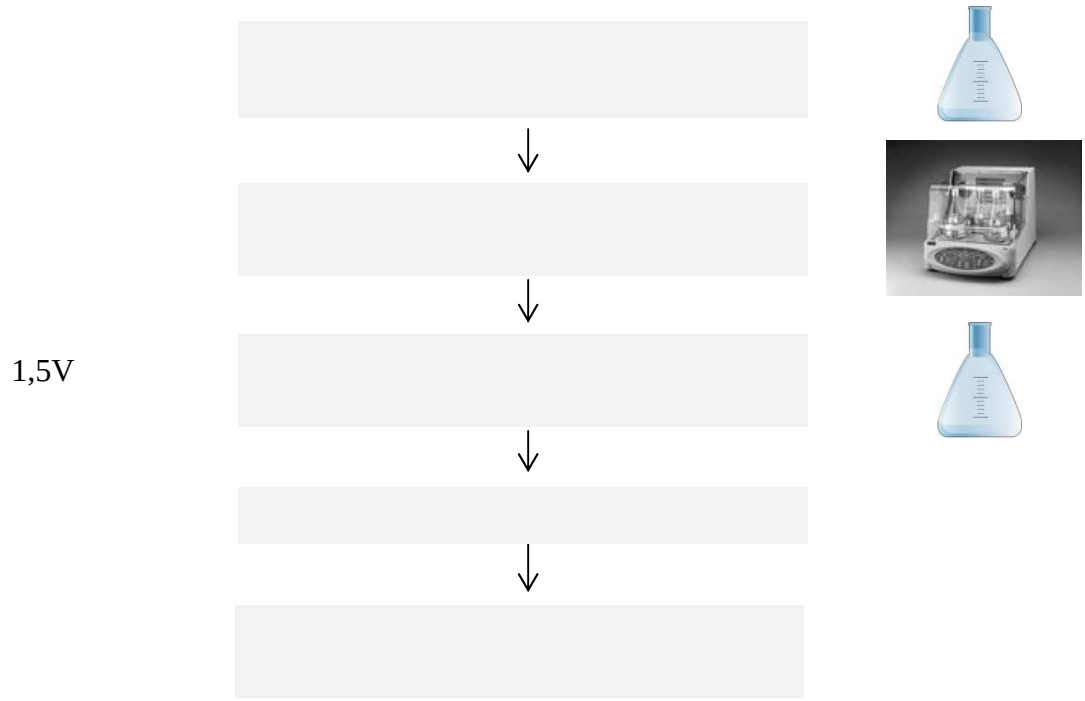


Figure 32 : Différentes étapes et paramètres associés pour les tests de détoxication de la ZEA par du mycélium en croissance.

Les pourcentages d'élimination de la ZEA ont été calculés grâce à la ZEA résiduelle dosée dans les essais, comparée à celle dosée dans les témoins (milieu sans mycélium ou bactéries).

Tableau 32 : Conditions d'adsorption en fonction des différents essais effectués.

Essais	Souches utilisées	[M][1]	Durée d'incubation	Volume (mL)
Criblage	*Aspergillus* de la section Nigri *Streptomyces*	1 µg/mL 50 µg/mL 10 µg/mL	7 jours	1 mL
Influence de la concentration en ZEA	CA936 (*A. niger*)	1-150 µg/mL	0-96h	1 mL
Production de ZEA-sulfate	CA936	50 µg/mL	96h	20 mL

[1] : Concentration en mycotoxine.

Les *Aspergillus* de la section Nigri ont été cultivés dans du CYB et les actinomycètes dans de l'ISP2. Des cinétiques de transformation ont été réalisées.

II.5.2 Essai de conversion de la ZEA par des cellules entières

Après croissance des souches avec ou sans ZEA, le mycélium est récupéré et lavé avec de l'eau physiologique. Il est ensuite resuspendu dans du tampon phosphate-citrate à pH 6, contaminé par 1 µg/mL de ZEA pour le test de l'activité enzymatique (cf II.5.4).

II.5.3 Essai de conversion de la ZEA par de l'extrait brut ou des fractions protéiques

II.5.3.1 Lyse des cellules

Différents moyens de lyse du mycélium ont été utilisés (sonication, broyage à billes…), évalués sur le rendement en protéines intracellulaires. Le plus efficace (broyage à bille dans l'azote liquide, 1 min) a été conservé pour la suite des expériences.

II.5.3.2 Essai d'optimisation du tampon d'extraction

Pour essayer d'observer une activité de dégradation de la ZEA dans l'extrait brut, différents tampons d'extraction ont été testés. Pour éviter une dégradation des protéines intracellulaires, nous avons ajouté au tampon phosphate-citrate (0,05M), du glycérol (10%), du NaCl (0,1M), un anti-oxydant le DTT (0,5 mM), un cocktail commercial anti-protéases. D'autres molécules ont aussi été ajoutées comme éventuels éléments manquants dans le milieu, cofacteurs notamment ($MgCl_2$ 0,03M ; $ZnCl_2$ 0,01M ; $FeSO_4$ 10 mg/L ; $CuSO_4$ 5 mg/L, ATP 5 mM ; NADP 5 mM). Toutes les étapes à partir de la lyse des cellules doivent être effectuées à une température inférieure à 4°C.

II.5.3.3 Concentration de l'extrait brut par précipitation au sulfate d'ammonium

Une méthode de concentration de protéines largement utilisée est la concentration au sulfate d'ammonium. Elle permet de séparer les protéines selon leur solubilité en présence de sels. Dans notre étude, les protéines intracellulaires ont été concentrées par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium avec des pourcentages de saturation de 0-40%-60%-80%. Les protéines ont ensuite été récupérées dans le culot par centrifugation (5000g, 20 min) et resupendues dans 2 mL de tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7. Les différentes fractions protéiques ont été dialysées (Spectra/Por Biotech, ester de cellulose, 15 kDa) contre du tampon Tris-HCl, 50 mM, pH 7 et leurs activités enzymatiques ont été testées.

II.5.3.4 Dosage des protéines

Le suivi de la lyse des cellules et de la précipitation a été effectué par dosage des protéines par la méthode micro de Bradford (1976). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance des protéines du à la liaison du bleu de Comassie avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) présent dans la ou les protéines. La mesure d'absorbance s'effectue à 595 nm. Le standard utilisé était la BSA (« Bovine Serum Albumine ») de concentration entre 1 et 10 mg/mL.

II.5.4 Détection de l'activité de transformation de la ZEA

Pour détecter une activité éventuelle de transformation de la ZEA, les cellules entières (environ 1g) sont placées dans 1 mL de tampon phosphate-citrate, pH 5, 0,05M contaminé par 1 µg/mL de ZEA et laissées incubées 24h à 28°C dans un bain-marie. De même pour l'extrait brut et les fractions protéiques, de la ZEA est ajouté à ces fractions pour obtenir une concentration finale de 1 µg/mL et sont laissées incubées 24h à 28°C dans un bain-marie.

II.6 Détermination de la structure chimique du produit formé

II.6.1 Mise en évidence de la présence d'un conjugué

La présence d'un conjugué de la ZEA a été déterminée par analyses LC/MS, au Centre d'Energie Atomique (CEA) de Saclay. La colonne utilisée est une colonne 150 × 2 mm Kromasil 5 µm C18 column (Interchim, Montluçon). Le signal a été analysé par UV avant injection dans le spectrophotomètre de masse au travers une source d'ionisation electrospray (ESI) réglée à 330°C,

4500 V, 40 psi de gaz et 9 L/min de gaz, en mode d'ionisation négatif. La phase mobile, réglée à un debit de 0,2 mL/min, était composée de 10 mM d'acétate d'ammonium dans un mélange eau/ACN (90/10 v/v) comme solvant A et un mélange eau/ACN (10/90 v/v) comme solvant B. Le profil d'élution a commencé par 10% de solvant B pendant 2 minutes, suivi d'un gradient linéaire jusqu'à 80% de solvant B en 22 minutes. Après 2 minutes de profil isocratique, le système retourne aux conditions initiales en 2 minutes. Les échantillons ont été gardés à 4°C jusqu'à l'analyse. Un volume de 20 µL est injecté dans le système chromatographique. Les optimisations des signaux MS et MS^2 ont été effectués sur la ZEA. L'acquisition des données a été effectuée par un logiciel de Bruker Softwares.

II.6.2 Purification du conjugué

Une production du conjugué observé (ZEA-sulfate) a été menée en incubant la souche CA936 dans du milieu contaminé par 50 µg/mL de ZEA. Afin de solubiliser la ZEA-sulfate et de la mettre dans le solvant de départ de la purification, l'échantillon obtenu est évaporé et resuspendu dans 10% d'ACN. La ZEA a ensuite été séparée de la ZEA-sulfate par passage sous vide sur une colonne C_{18} Sepak (Waters, Guyancourt). Après equilibration de la colonne, le conjugué purifié est élué dans la première fraction d'éluat 50:50 (ACN/eau). La ZEA est éluée dans le deuxième éluat de 100% d'ACN.

II.6.3 Détermination de la masse exacte du conjugué

La masse exacte du conjugué a été déterminée sur la fraction purifiée par Sepak au CEA de Saclay sur l'appareil LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis). Cet appareil permet une précision de masse de moins de 5 ppm. La détection a été effectuée par ionisation par electrospray (ESI) à une résolution de 30000 en mode d'ionisation négatif.

II.6.4 Confirmation de la structure par hydrolyse enzymatique

Pour savoir si le produit inconnu observé était un conjugué de la ZEA, une hydrolyse enzymatique du conjugué purifié par Sepak a été effectué par un cocktail enzymatique commercial comprenant 250 UI de sulfatase Helix Pomatia et 5250 UI de glucuronidase pendant 17h à 37°C dans du tampon acétate à 0,1 M à pH 5,2.

II.7 Culture des cellules MCF-7 et test de prolifération

II.7.1 Mise en culture des cellules MCF-7

La lignée cellulaire utilisée pour le test de prolifération est la lignée MCF-7 (ATCC HTB-22), fournie chez LGC Prochem (Le Perreux Sur Marne). Ces cellules ont été isolées à partir de cellules tumorales mammaires en 1973. Elles sont depuis peu très utilisées dans la recherche contre le cancer. Les cellules ont été utilisées dans notre étude du 152ème passage au 162ème passage.

Les souches cellulaires ont été conservées dans de l'azote liquide dans 1 mL d'une solution de congélation (1 mL de milieu de culture contenant 10 % de DMSO, 40 % de SVF). Sorti de l'azote liquide, le tube reste 1 min à température ambiante avant d'être porté à 37°C, 1 min dans un bain-marie. 10 mL de milieu de culture supplémenté (10 % de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine), préalablement chauffé à 37 °C, est versé dans une flasque de 75 cm^2 avec 1 mL de la culture de cellule décongelée. Une nuit à 37 °C permet l'adhésion des cellules au support. Au bout de trois jours, les cellules ne pouvant plus se développer correctement due à l'épuisement du milieu de culture, il est nécessaire d'effectuer un passage ou repiquage pour maintenir la viabilité des cellules et l'état de culture. Cette opération permet l'amplification de la culture cellulaire. Les cellules MCF-7 ont été utilisées dans cette etude du 152ème passage au 162ème passage.

II.7.2 Maintien en culture des cellules MCF-7

La lignée cellulaire MCF-7 (ATCC HTB-22) a été cultivée dans des flasques de 75 cm^2 contenant 15 mL de milieu DMEM supplementé par 1% de glutamine, 1% d'une solution d'antibiotiques pénicilline/streptomycine, 10% de SVF et 0.1% d'insuline dans une étuve à 37°C conservant une atmosphère humide et saturée à 5% de CO_2 dans une étuve stérile. Des conditions d'aseptie strictes ont été maintenues pour la manipulation de ces cellules. Le système tampon utilisé est le bicarbonate (HCO_3^-) en équilibre avec le $C0_2$ de l'étuve, permettant de maintenir un pH de 7,4. Dans le milieu de culture est inclus un indicateur de pH : le rouge de bromophénol virant au violet ou au jaune pour des pH respectivement, alcalins ou acides.

II.7.3 Passage des cellules

Cette étape consiste à réduire environ de moitié le nombre de cellules contenues dans les boites quand les cellules sont à confluence. Le repiquage est effectué à 80% de confluence. La Figure 33 montre le protocole de passage des cellules. Le milieu de culture est aspiré et on ajoute 5mL de tampon phosphate salin (PBS) destiné à préparer les cellules à l'action de la trypsine. Après environ 30s de contact, le tampon phosphate est aspiré et 1mL de 0,25% trypsine-EDTA est ajouté dans chaque flasque qui est mise à l'étuve pendant 5 min. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de 5 mL de milieu de culture (contenant des facteurs inhibant l'activité de cette enzyme). Les cellules décrochées sont centrifugées 10 min à 150 g à 4 °C et le culot est remis en suspension. La suspension cellulaire obtenue est répartie dans différents flacons, à raison de 1mL par flacon avec 14 mL de milieu de culture. Les cellules MCF-7 ont une croissance faible et sont repiquées toutes les semaines environ.

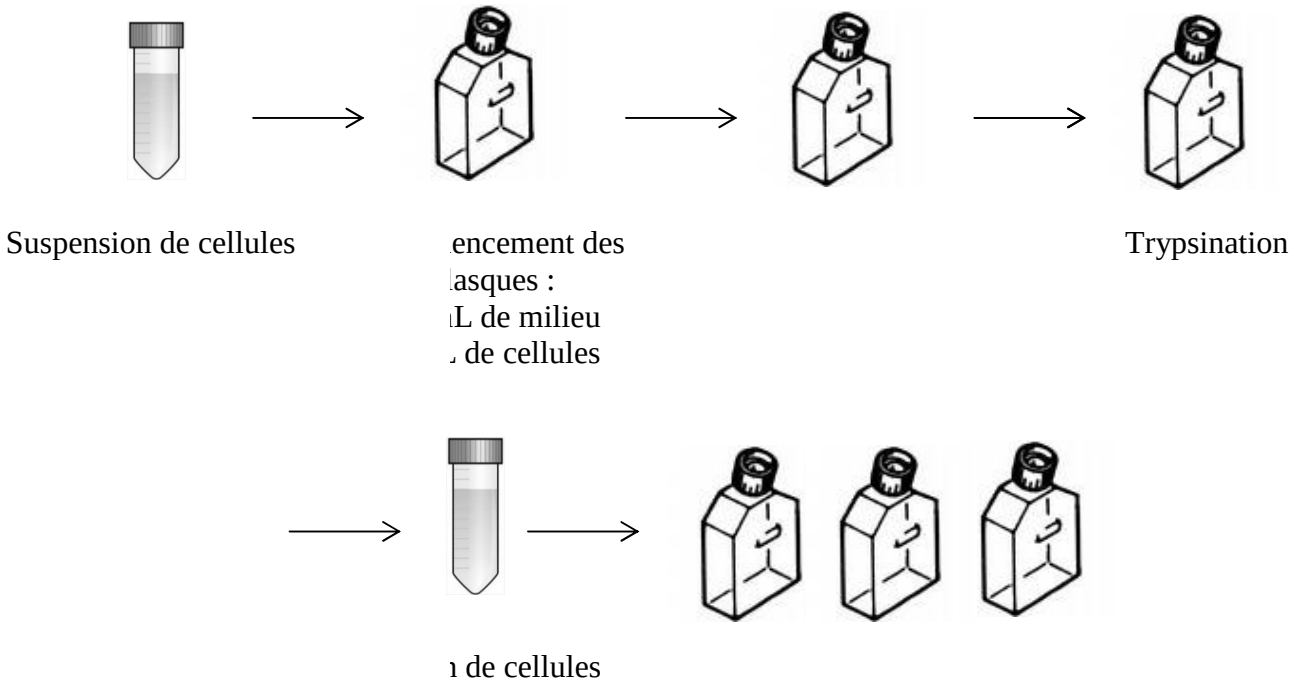


Figure 33 : Amplification des cellules MCF-7.

II.7.4 Mise en conservation d'une culture cellulaire

A confluence, les cellules d'une flasque, sont trypsinées pendant 5 min à 37°C avec le tampon trypsine décrit précédemment. Après centrifugation, le culot cellulaire est suspendu dans la solution de conservation préalablement décrite dans la section II.7.1. Après homogénéisation, cette

solution (1mL) est stockée dans un tube cryogénique plongé dans de l'isopropanol à -80°C. Une fois les cellules refroidies doucement, elles sont stockées dans de l'azote liquide.

II.7.5 Test de prolifération

Après amplification d'une quantité suffisante de cellules pour le test, une suspension cellulaire dans du milieu DMEM, 1% de glutamine (GLU), 1% de solution antibiotique streptomycine, ampicilline (AA), 5% de sérum de veau fétal (SVF) a été préparée afin de déposer environ 5000 cellules par puits à raison de 90 µL dans chaque puits d'une plaque 96 puits. La quantité de SVF a été diminuée par rapport à celle utilisée pour le maintien des cellules. En effet, le SVF adsorbe les mycotoxines et diminue ainsi la concentration réelle en contact avec les cellules. Il faut donc mettre la concentration de SVF minimale pour la croissance des cellules. Les différentes étapes du test sont résumées sur la Figure 34. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24h pour qu'elles s'attachent à la paroi des puits. Le milieu est ensuite changé par le même milieu comprenant cette fois 5% de SVF traité au charbon au lieu du SVF non traité. En effet, le SVF non traité peut contenir des hormones bovines qui influerait sur la croissance des cellules et biaiserait le test. Les molécules toxiques à tester sont dissoutes dans le milieu de culture contenant 5% de SVF traité au charbon. Chaque condition est testée à l'identique 4 fois. Un témoin négatif correspondant aux cellules seules sans composés à tester est inclus dans chaque plaque. Après 5 jours d'incubation, la quantité de cellules vivantes est évaluée en utilisant le test CellTiter96®Aqueous (Promega). Pour ce faire, 20 µL de réactif est ajouté à chaque puit et laissé incuber 3h. L'absorbance à 490 nm, correspondant à l'apparition du formazan à partir du MTS ou 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (cf Figure 35), transformation effectuée par les cellules viables est alors mesurée dans un lecteur UV à plaque. L'absorbance est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

L'indice de proliferation est ensuite determiné en calculant le ratio de la moyenne de la densité optique obtenue pour l'essai sur la moyenne de la densité optique obtenue pour le témoin négatif. Si le composé a un comportement oestrogénique, l'indice de prolifération sera supérieur à 1. En effet, cela veut dire que les cellules, sensibles aux composés oetrogéniques, prolifèrent en présence du composé. Si le composé n'a pas de propriétés oestrogéniques, l'indice de proliferation sera égal à 1. Plus le composé est oestrogénique, plus l'indice de proliferation sera important.

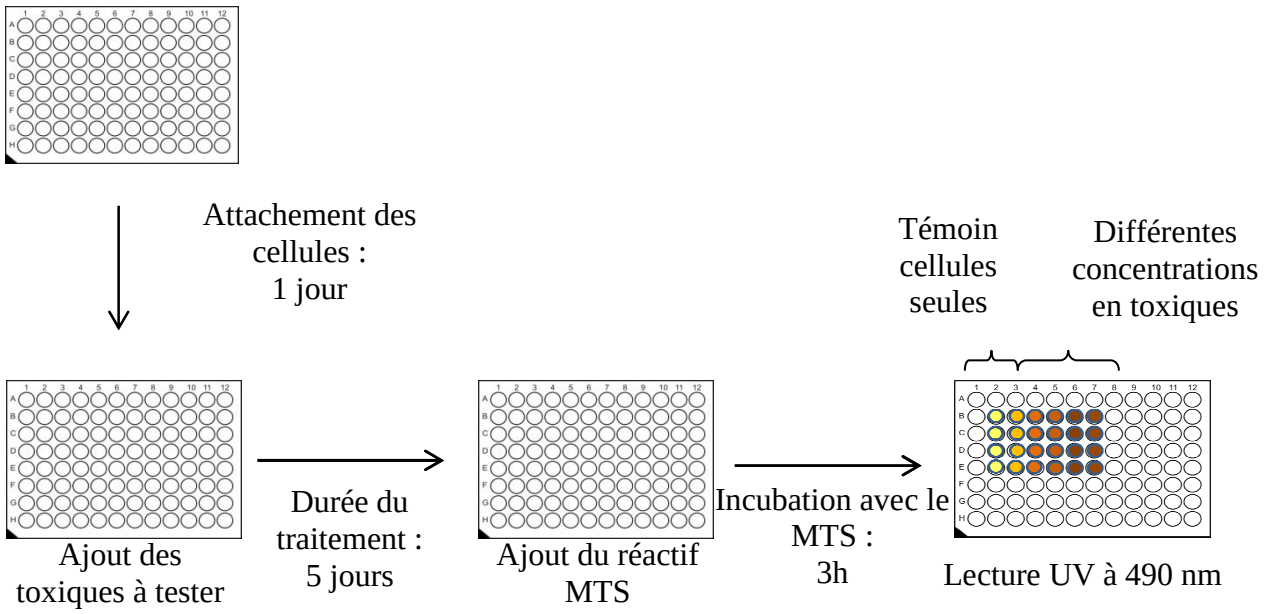


Figure 34 : Test de prolifération cellulaire.

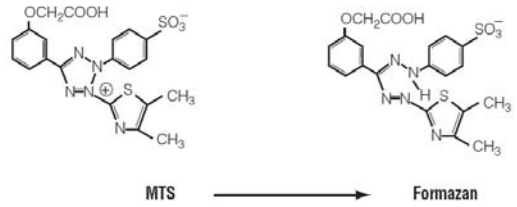


Figure 35 : Transformation du MTS en formazan.

La toxicité des surnageants obtenus par croissance de la souche *A. niger* CA936 incubée en présence de 50 µg/mL de ZEA pendant au maximum 96h a été testée. Les échantillons ont été dilués au préalable 10 000 et 100 000 fois (correspondant à une concentration en ZEA de 16 nM et 1,6 nM).

La gamme de concentrations testées pour les échantillons de ZEA, de 17-β-estradiol et de ZEA-sulfate purifiée est de 1 pM à 1 nM. La concentration de ZEA-sulfate testée a été déterminée en prenant l'hypothèse que la ZEA et la ZEA-sulfate ont le même coefficient de réponse en détection fluo. En réalité, la concentration en ZEA-sulfate a sûrement été sous-estimée ce qui augmente encore plus le phénomène observé.

II.8 Analyses statistiques

Les analyses ont été effectuées en triple pour tous les essais et en quadruple pour les tests de prolifération. Les moyennes et écart-types ont été calculées. Les moyennes ont été comparées par le test ANOVA grâce au logiciel Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software; Reading, Pennsylvania, USA). Le seuil pour déterminer une difference significative entre 2 valeurs a été fixé à une valeur de p inférieure à 0,05.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Le travail réalisé peut être séparé en 2 grandes parties distinctes :

- L'étude de l'adsorption de mycotoxines par des spores d'*Aspergillus* de la section Nigri (cf Chapitres 1 et 2).
- L'étude de la détoxication de la ZEA par des isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri (cf Chapitres 3 et 4).

Le but de la première partie du travail a été de développer un nouveau type d'adsorbant de mycotoxines composé de spores inactivées de moisissures. De nombreux adsorbants existent mais ne sont en général pas efficaces pour toutes les mycotoxines. Il est dès lors important de diversifier les moyens de décontamination pour éventuellement compléter le panel d'adsorbants disponibles. Il est également envisageable de mélanger plusieurs types d'adsorbants pour obtenir une élimination des mycotoxines la plus complète possible.

Les différentes étapes de l'étude sont résumées sur la Figure 36. L'adsorption a d'abord été évaluée *in vitro* dans un milieu simple tamponné. Des essais complémentaires simulant des conditions réelles de contamination ont été effectués dans le cas de la ZEA. L'étude de l'adsorption a ensuite été élargie à d'autres mycotoxines. Des analyses de surface des spores ont été effectuées afin de mieux comprendre l'interaction spores/mycotoxines et d'émettre des hypothèses sur les composés impliqués. Enfin, pour valider l'efficacité du procédé par rapport à d'autres adsorbants commerciaux, une comparaison d'efficacité a été effectuée.

La deuxième partie du travail a consisté en la recherche de microorganismes pouvant transformer la ZEA en composés moins toxiques. Pour ce faire, plusieurs isolats ont été testés (*Aspergillus* de la section Nigri ou Actinomycètes). Certains ont montré une capacité à éliminer la ZEA, et l'apparition d'un produit de transformation a pu y être corrélée. Ce produit a ensuite été isolé et caractérisé, ce qui a conduit à son identification. Sa toxicité a enfin été déterminée par la mise en place de test de prolifération cellulaire de lignée cellulaire sensible aux composés oestrogéniques. Des essais de purification des activités enzymatiques correspondantes ont été effectués en parallèle. Les différentes étapes de cette étude sont résumées sur la Figure 37.

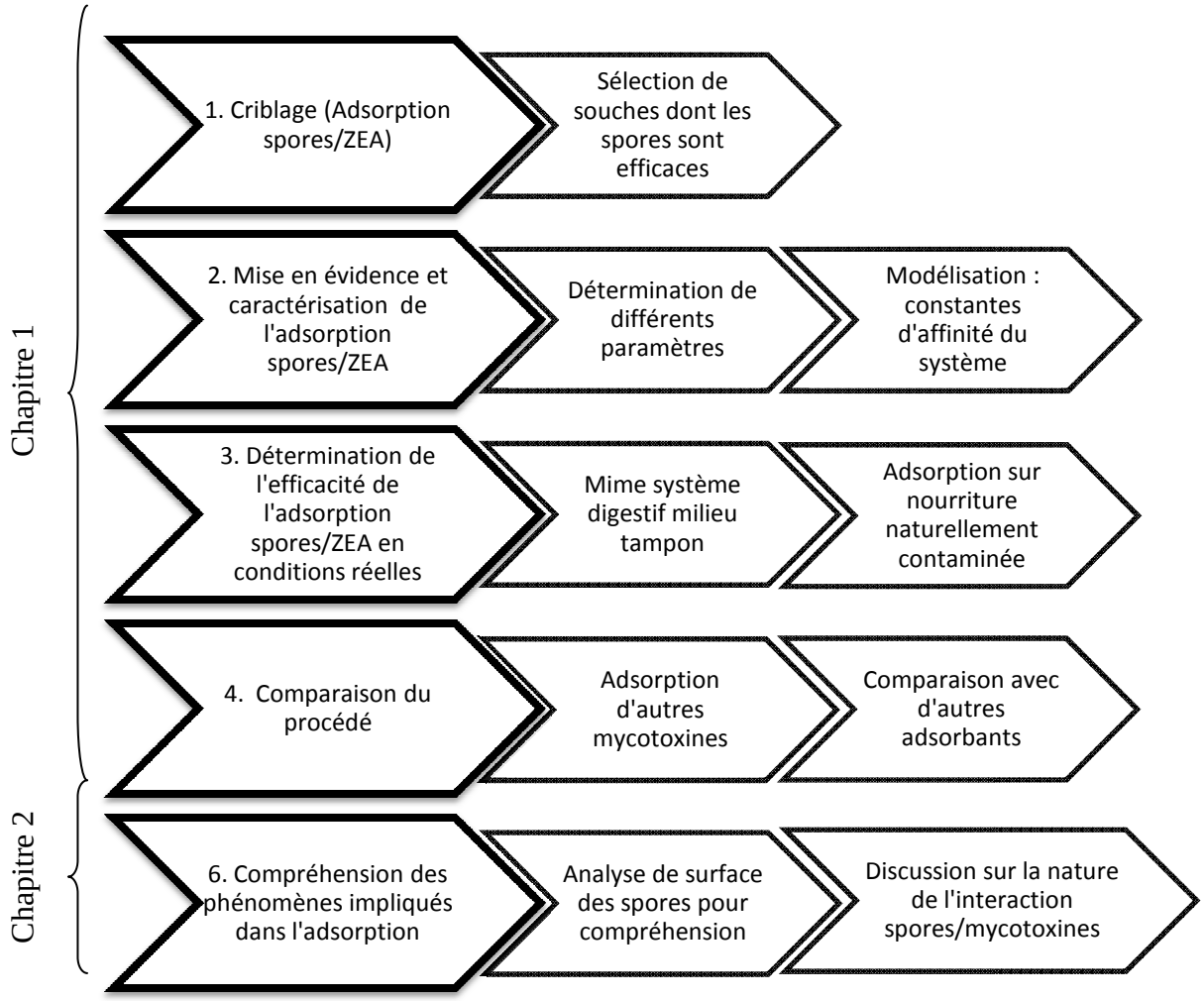


Figure 36 : Différentes étapes de la stratégie d'étude des spores comme adsorbants de mycotoxines.

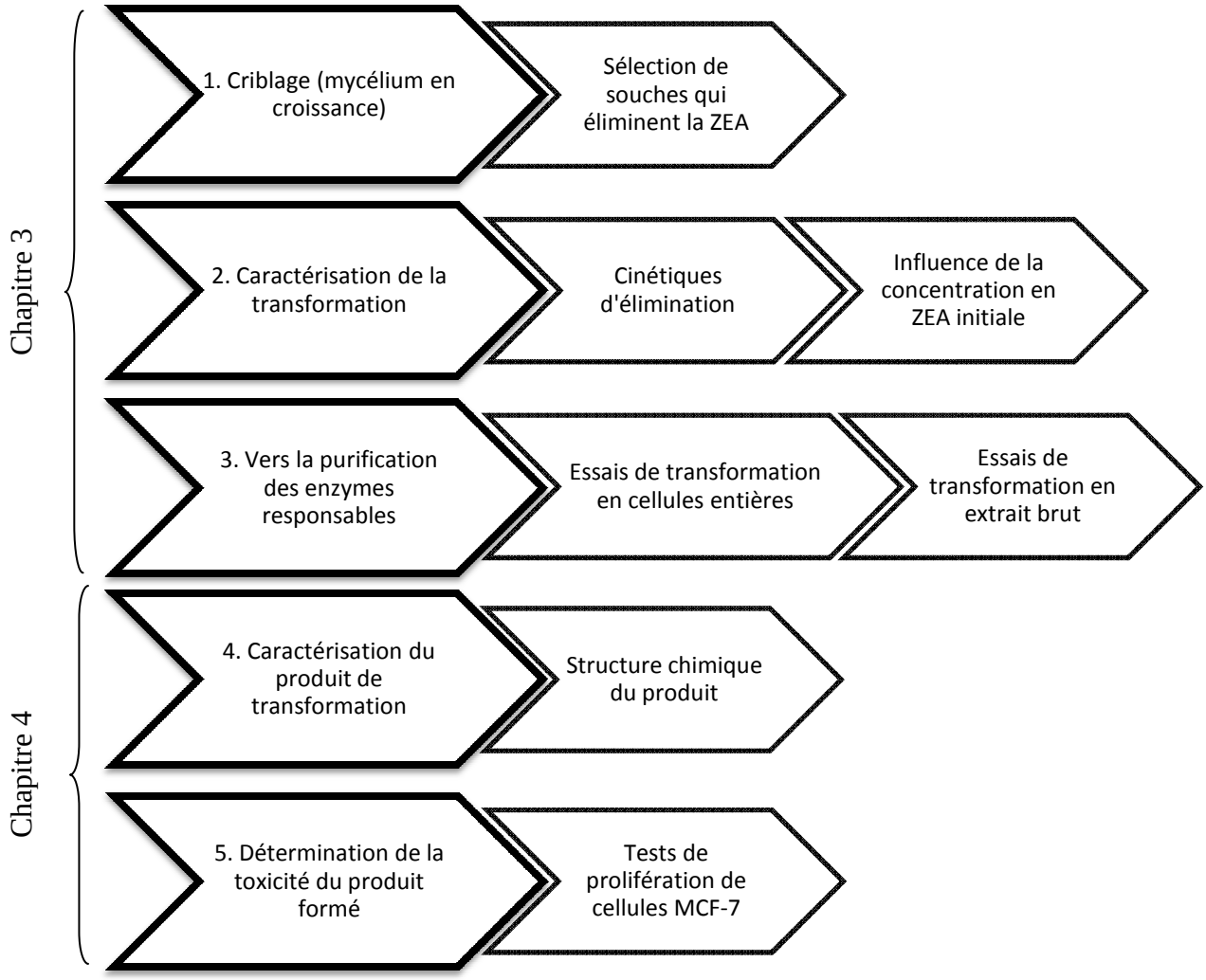


Figure 37 : Différentes étapes de la stratégie d'étude de la détoxication de la ZEA.

Chapitre 1 : Mise en évidence *in vitro* de l'adsorption de la zéaralénone sur des spores d'*Aspergillus* de la section Nigri

I Adsorption de la zéaralénone par des spores de différentes souches d'*Aspergillus* de la section Nigri

La première étape de l'étude a consisté en un essai d'adsorption de spores d'isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri, pour déterminer la capacité de leurs spores à adsorber la ZEA. Les spores de 2 isolats d'*A. niger* (GX312, MuX44) et de 3 isolats d'*A. japonicus* (AX35, CA223, Mu541) ont été testées. Ces isolats ont été choisis en raison de leur incapacité à produire de l'OTA, autre mycotoxine souvent produite par d'autres souches d'*Aspergillus* de la section Nigri.

Les spores de tous les isolats testés ont la capacité d'éliminer la ZEA dans un milieu tampon phosphate-citrate (0,05M, pH 6) contaminé par 1 µg/mL de ZEA (cf Figure 38). Celle-ci est éliminée entre 29% et 43% en moyenne selon les isolats, et ce dès le contact avec les spores. De manière globale, une incubation de 60 minutes n'améliore pas de façon significative l'élimination de la ZEA.

Parmi les 5 isolats testés, *A. japonicus* Mu541 a été choisi pour la suite des essais car ses spores présentent la moyenne d'élimination de la ZEA la plus importante juste après contact (43%), condition retenue pour la suite des expérimentations.

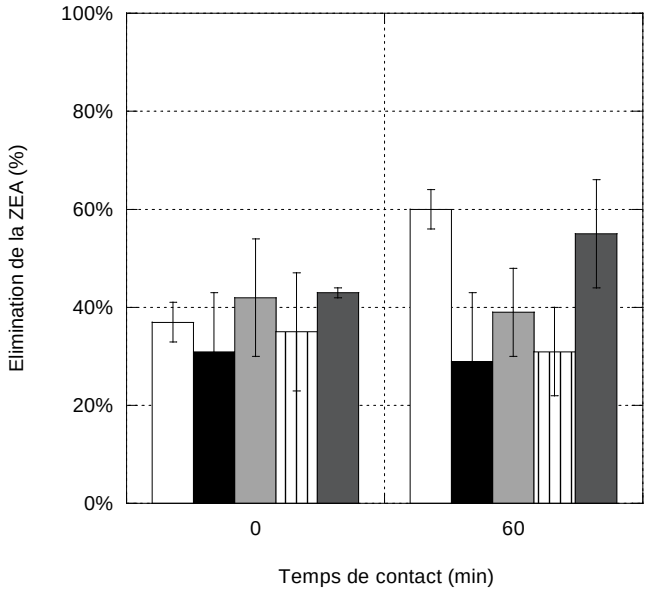


Figure 38 : Elimination de la ZEA par des spores vivantes et inactivées de 5 isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri (3 *A.japonicus* : AX35 □, CA223 □, Mu541 ■ et 2 *A. niger*: GX312 ■, MuX44 ▥). L'élimination a été observée juste après contact ou après 60 minutes.

Une cinétique d'adsorption a été effectuée de 0 à 120 min. L'adsorption étant quasiment identique pour tous les temps, seule l'adsorption à 60 minutes est présentée dans ce document.

II Caractérisation de l'adsorption spores/ZEA

II.1 Confirmation du phénomène d'adsorption

II.1.1 Test d'adsorption par des spores inactivées

Afin de valider l'hypothèse d'adsorption, des spores de l'isolat Mu541 ont été inactivées et ont été utilisées en tant qu'adsorbants comme précédemment.

Différentes conditions de traitements à la chaleur ont été testées :

- L'inactivation à l'acide chlorhydrique : traitement au préalable des spores à l'HCL (2N)
- L'inactivation par autoclavage :
  - C1 : 121°C, 20 min, 1,2 bars
  - C2 : 121°C, 40 min, 1,2 bars
  - C3 : 121°C, 60 min, 1,2 bars
  - C4 : 121°C, 90 min, 1,2 bars
  - C5 : 130°C, 10 min, 1,2 bars
  - C6 : 140°C, 5 min, 1,2 bars

Les spores ainsi traitées (5.10^7 spores/mL) ont en suite été mises en contact avec la ZEA (1 µg/mL) dans du tampon phosphate-citrate (0,05M, pH 6). Le traitement à l'acide chlorhydrique ou à la chaleur (C1, C2, C3) ne modifie pas la capacité d'adsorption des spores (cf Figure 39). Seules des conditions d'inactivation très drastiques (cas 4, 5 et 6) permettent une augmentation significative de l'adsorption de la ZEA sur les spores. Pour des raisons de commodité, les spores utilisées par la suite ont subies le traitement à la chaleur standard (121°C, 20 min, 1,2 bars).

L'inactivation des spores a été vérifiée par ensemencement de celles-ci après traitement sur milieu CYA : Moins de 2 spores vivantes pour 10^8 spores totales ont pu former une colonie après incubation à 28°C pendant 10 jours. L'inactivation est donc efficace, et les spores n'ont pas besoin d'être vivantes pour éliminer la ZEA.

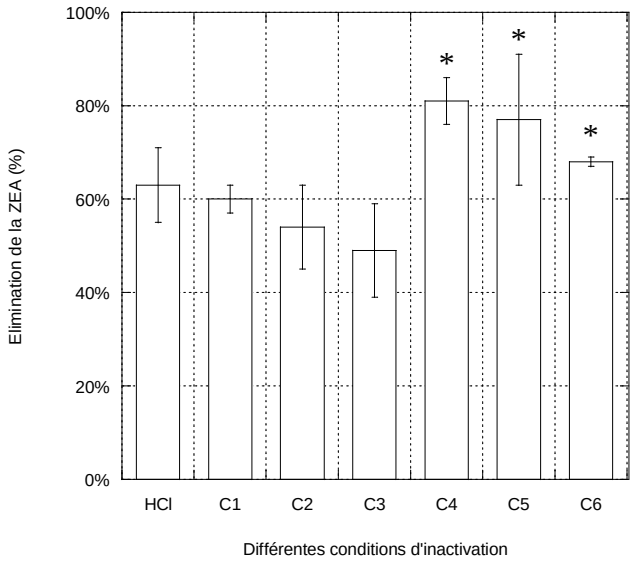


Figure 39 : Influence des différents traitements à la chaleur sur l'efficacité des spores à adsorber la ZEA.

II.1.2 Efficacité réelle de l'adsorption par les spores

Etant donné que la ZEA est peu soluble dans l'eau, et pour déterminer l'adsorption réelle de la ZEA sur les spores, des expériences de récupération de la ZEA à des fins de dosage ont été réalisées, d'abord sur des témoins, puis en conditions expérimentales.

II.1.2.1 Essais préliminaires sur les témoins

Des témoins négatifs (ZEA en solution sans spores) ont été effectués dans du tampon phosphate-citrate (0,05M, pH 6). Les étapes habituelles de lavage et d'extraction au méthanol (cf matériel et méthodes) ont été mises en oeuvre sur ces témoins, afin de déterminer la part de ZEA soluble et insoluble dans ces conditions (concentration initiale en ZEA égale à 8 µg/mL).

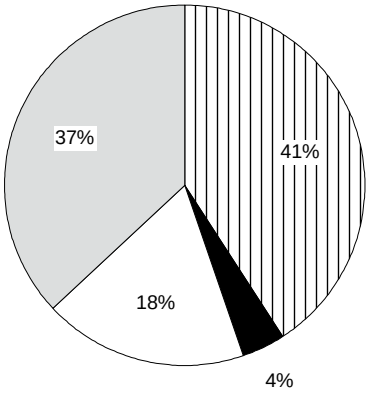


Figure 40 : Distribution de la ZEA lors des différentes étapes du procédé d'extraction (ZEA dans le filtrat ▥, ZEA dans l'eau de lavage ■, ZEA dans l'extrait méthanolique □, ZEA non dosée ▨) pour les témoins négatifs (ZEA sans spores).

41% de la ZEA initiale se retrouve dans le filtrat, correspondant à la ZEA soluble et non adsorbée sur le filtre (cf Figure 40). 4% de la ZEA est retrouvée après lavage du filtre à l'eau. 18% de la ZEA est extraite au méthanol. Il peut ici s'agir de la ZEA insoluble qui par extraction au méthanol s'est solubilisée et s'est retrouvée dans l'extrait. 37% de la ZEA initiale n'est pas dosée dans le témoin. Tous les calculs d'adsorption ont été effectués par rapport à la part de ZEA dosée dans le filtrat soit la ZEA soluble. Si la ZEA insoluble est capable de s'adsorber sur les spores, la capacité d'adsorption a de ce fait été sous-estimée.

II.1.2.2 Extraction au méthanol de la ZEA adsorbée

Après adsorption classique de la ZEA sur les spores, différentes étapes de récupération de la ZEA ont été effectuées sur le filtre contenant les spores et la ZEA potentiellement adsorbée dessus. Le filtre est rinçé à l'eau puis au méthanol. Les quantités de ZEA obtenues sont alors comparées à la quantité de ZEA théorique initiale (cf Figure 41). Dans ces conditions, 30 % de la ZEA initiale théorique est retrouvée dans le filtrat. Cela représente la ZEA résiduelle non adsorbée. 11% de la ZEA initiale est désorbée par le lavage à l'eau. 42% de la ZEA initiale est extraite par du méthanol. 18% de la ZEA n'est pas directement dosée. Cela comprend certainement de la ZEA non extraite par le méthanol mais toujours adsorbée sur les spores.

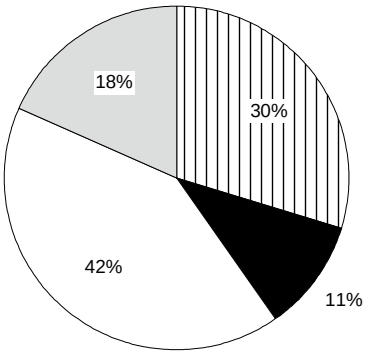


Figure 41: Distribution de la ZEA lors des différentes étapes du procédé d'extraction (ZEA dans le filtrat ▥, ZEA dans l'eau de lavage ■, ZEA dans l'extrait méthanolique □, ZEA non dosée ▒).

Afin de déterminer l'influence de la ZEA insoluble dans l'adsorption, la quantité de ZEA dosée dans le filtrat, dans l'eau de lavage et dans l'extrait méthanolique a été comparée à la quantité de ZEA soluble (filtrat) dosée dans le témoin et à la quantité de ZEA totale dosée dans le témoin. Les moyennes et écart-types sur les 5 essais sont présentées sur le Tableau 33.

Tableau 33 : Pourcentage de ZEA dosée dans les échantillons (filtrat, lavage, extrait) par rapport à la quantité de ZEA soluble et insoluble dosée dans les témoins.

	Par rapport à la ZEA soluble dans le témoin	Par rapport à la ZEA totale dosée dans le témoin (dans filtrat + dans lavage + dans extrait)
% libre (filtrat)	36% ± 24%	22% ± 16%
% lavage (eau)	11% ±2%	6% ± 1%
% adsorbée extraite (méthanol)	81% ±20%	48% ± 12%
% total dosée	121% ±15%	78% ± 17%

La quantité de ZEA totale dosée dans les échantillons (filtrat + eau + extrait méthanolique) est plus importante que la quantité de ZEA soluble dosée dans le témoin. Nous obtenons ainsi un pourcentage de ZEA dosée dans les échantillons par rapport à la ZEA soluble de 121% en moyenne. En prenant en compte la ZEA totale dosée dans le témoin (filtrat + eau + extrait méthanolique), nous obtenons un pourcentage de 78% en moyenne. Ainsi, la ZEA insoluble peut, en partie, s'adsorber sur les spores. Les résultats présentés dans cette étude prennent en compte l'élimination uniquement par rapport à la ZEA soluble du témoin. L'élimination de la ZEA est donc potentiellement sous-estimée de 22% environ.

II.2 Influence de la concentration en spores sur l'efficacité d'adsorption

Pour les spores vivantes et les spores inactivées (condition standard d'autoclavage), l'influence de la concentration en spores a été testée de 10^6 à 2.10^8 spores/mL pour une concentration en ZEA fixe de 1 µg/mL dans du tampon phosphate-citrate (0,05M, pH 6). Dans les 2 cas, plus la concentration en spores introduite est importante, plus l'élimination de la ZEA du milieu par adsorption est importante (cf Figure 42). Ainsi, pour une concentration de 10^6 spores traitées par mL, l'adsorption de la ZEA est de 29% alors qu'elle est de 80,3% pour une concentration en spores inactivées de 2.10^8 spores par mL.

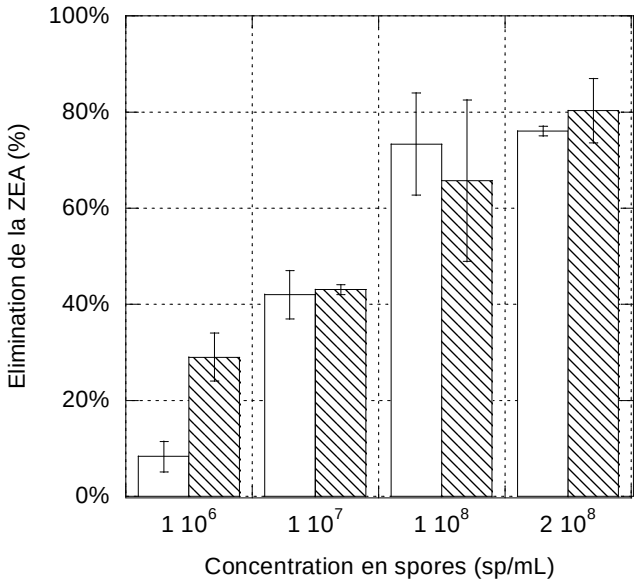


Figure 42 : Adsorption de la ZEA par des spores vivantes (☐) et inactivées (▨) de l'isolat d'*A. japonicus* Mu541 pour plusieurs concentrations en spores (10^6; 10^7; 10^8; 2.10^8 spores/mL) dans un tampon phosphate-citrate (0,05M, pH 6) contaminé par 1 µg/mL de ZEA.

II.3 Influence du pH sur l'efficacité d'adsorption

L'adsorption a été testée à different pHs (de pH 2 à pH 11) soit dans du tampon phosphate-citrate (de pH 2 à pH 8) soit dans du tampon borate (de pH 9 à pH 11). A pH 2, 53% de la ZEA est adsorbée alors qu'à pH 11, seule 2% de la ZEA est adsorbée (cf Figure 43). L'efficacité d'adsorption de la ZEA par les spores diminue quand le pH augmente.

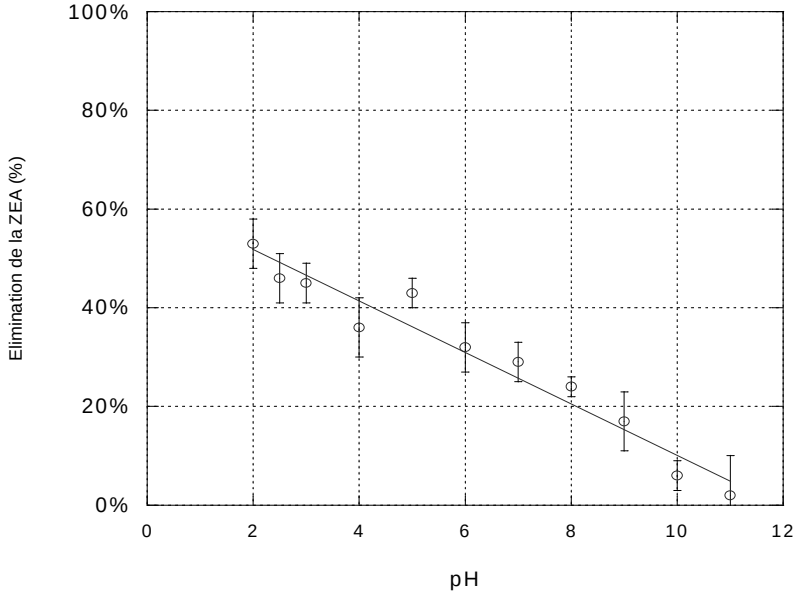


Figure 43 : Adsorption de la ZEA par des spores nactivées de l'isolat d'*A. japonicus* Mu541 à différents pH (de pH 2 à pH 11) pour une concentration en spores de 10^7 spores/mL dans un tampon phosphate-citrate ou borate (0,05M) contaminé par 1 µg/mL de ZEA.

III Modélisation de l'adsorption spores-ZEA

Différents modèles mathématiques (Hill, 1910 ; Freundlich, 1906 ; Langmuir, 1916) ont été essayés pour déterminer celui qui correspondait le mieux aux points expérimentaux. Le modèle de Hill (1910) a permis de tracer la courbe de la ZEA adsorbée en fonction de la ZEA initiale (cf Figure 44), et de définir différents paramètres qui caractérisent l'adsorption (cf Tableau 34).

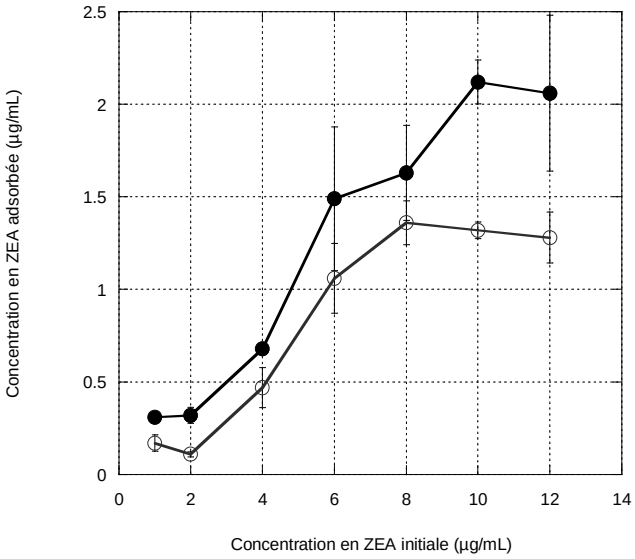


Figure 44 : Concentration en ZEA adsorbée en fonction de la concentration en ZEA initiale à pH 2,5 (●) et à pH 6 (○).

Tableau 34 : Paramètres d'adsorption calculé par le modèle de Hill pour l'adsorption de la ZEA et des spores inactivées de Mu541 (10^7 spores /mL) à pH 2,5 et à pH 6.

Paramètres d'adsorption[a]	pH 2,5	pH 6
n	1,6 ± 0,5	2,8 ± 0,4
ZEA_{ads}^{max} (µg/mL)	3,2 ± 0,2	1,5 ± 0,3
K_d (µg/mL)	7,2	4,8
A (%)	22,1	15,4
R^2	0,97	0,99

a

ZEA_{ads}^{max} : Quantité maximale de zéaralénone qui peut se fixer sur les spores

Kd : constante d'association de la ZEA

n : nombre de sites de fixation

Le coefficient de régression R^2 indique que le modèle de Hill convient bien aux valeurs expérimentales. La concentration en ZEA maximale pouvant s'adsorber sur les spores est en moyenne de 3,2 µg/mL à pH 2,5 et de 1,5 µg/mL à pH 6. Cela confirme bien une meilleure adsorption de la ZEA sur les spores à pH acide. Le nombre de sites de fixation est, en moyenne, de 1,6 à pH 2,5 et de 2,8 à pH 6. Cela montre un effet coopératif entre la ZEA et les spores, d'autant plus important que le pH est neutre. L'affinité est plus importante à pH 2,5 qu'à pH 6.

IV Etude de l'adsorption spores/ZEA en conditions proches de l'application industrielle

IV.1 Adsorption de la ZEA dans un mime de système digestif

Pour évaluer l'efficacité de l'adsorption dans des conditions de durée, de température et de pH proches d'un système digestif porcin, un mime *in vitro* a été réalisé d'après Döll *et al.* (2004), consistant en des passages plus ou moins longs à différents pH.

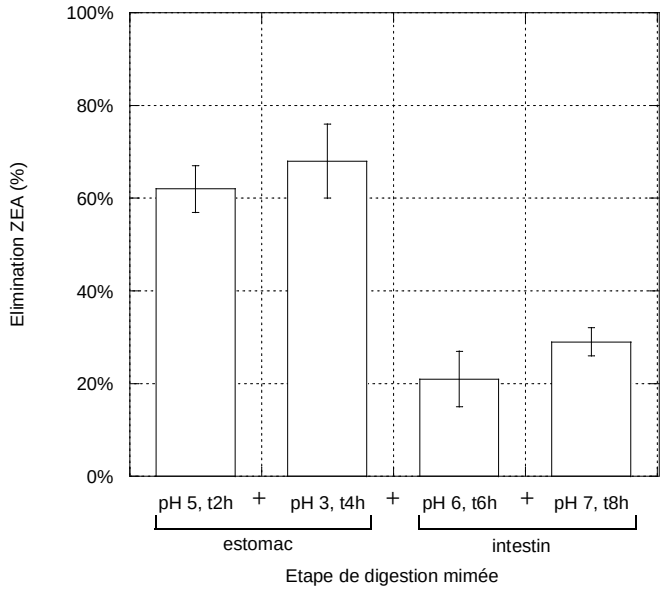


Figure 45 : Adsorption de la ZEA par des spores nactivées de l'isolat d'*A. japonicus* Mu541 dans un mime de système digestif pour une concentration en spores de 10^7 spores/mL dans du tampon phosphate-citrate (0,05M) contaminé par 1 µg/mL de ZEA.

62% de la ZEA est adsorbée pendant la phase estomac alors que seulement 29% de la ZEA est adsorbée pendant la phase intestin (cf Figure 45). Les conditions dans l'estomac (pH 5 pendant 2 heures puis pH 3 pendant 2 heures) sont donc plus favorables à l'adsorption de la ZEA sur les spores que les conditions dans la phase intestin (pH 6 pendant 2 heures puis pH 7 pendant 2 heures). Cela confirme une meilleure adsorption à pH acide.

IV.2 Adsorption en conditions solides

Les spores inactivées Mu541 ont été mises en contact avec du maïs broyé naturellement contaminé par de la ZEA. Etant donné qu'il était impossible de séparer les spores du maïs broyé, le dosage a été effectué sur le mélange maïs/spores. Si l'interaction spores/ZEA est forte, l'extraction nécessaire pour le dosage de la ZEA ne désorbera pas la ZEA fixée sur les spores.

Tableau 35 : Quantité de ZEA contenue dans le maïs naturellement contaminé par la ZEA, traité par ajout de spores Mu541 inactivées à raison de 1g ou 100 mg pour 25g de maïs.

Essai	Dosage de la ZEA en µg/kg (ou ppb)
Maïs naturellement contaminé	257,5 ± 23
Maïs naturellement contaminé traité avec 100 mg de spores	287 ± 8
Maïs naturellement contaminé traité avec 1 g de spores	210 ± 3

Une élimination de 18% en moyenne de la ZEA intiale est observée grâce à l'ajout d'1g de spores inactivées (cf Tableau 35). L'ajout de 100 mg de spores ne diminue pas le taux de ZEA dans le maïs. Ces résultats sont très inférieurs à ceux obtenus en milieu liquide.

IV.3 Adsorption en milieu complexe supplémenté en ZEA

L'adsorption a été testée dans un milieu complexe riche en nutriments obtenu à partir d'une bouillie d'aliments pour poulets supplémentée par de la ZEA à 1 µg/mL. Le but était ici de mimer ce qui pourrait se passer si on ajoutait des spores à la ration alimentaire d'animaux. Pour les 2 concentrations étudiées, entre 81% et 94% en moyenne de ZEA initiale est éliminée par les spores (cf Tableau 36). Il y a donc adsorption de la ZEA même en milieu complexe.

Tableau 36 : Adsorption de la ZEA par les spores inactivées Mu541 dans un milieu complexe.

Concentration en spores (spores/mL)	Adsorption de la ZEA(%)
10^7	94% ± 2%
10^8	81% ± 2%

V Adsorption par les spores d'autres mycotoxines (OTA, FB1)

Afin de mieux comprendre l'interaction mycotoxines/spores, l'efficacité d'adsorption a été testée pour d'autres mycotoxines : l'OTA, et la FB1. Les manipulations ont été réalisées à deux pHs différents (pH 2,5 et pH 6), soit avec les mycotoxines seules (cf Figure 46A et B), soit en mélange à concentrations molaires identiques (cf Figure 46C et D).

En moyenne, l'adsorption semble être plus efficace à pH 2,5 qu'à pH 6 avec les mycotoxines seules. A pH 2,5, l'OTA est la plus adsorbée, devant la ZEA puis la FB1. A pH 6, seule la ZEA est adsorbée par les spores, et ce de façon un peu plus faible qu'à pH 2,5. Une forte influence du pH sur l'adsorption de l'OTA est observée. En effet, environ 80% de l'OTA est adsorbée par les spores à pH 2,5 alors qu'il n'y plus que moins de 20% de l'OTA adsorbée à pH 6. La FB1 est la mycotoxine la moins facilement adsorbée quelques soient les conditions de pH.

Le mélange de mycotoxines ne semble pas diminuer de façon importante l'efficacité d'adsorption pour l'une ou l'autre des mycotoxines aux deux conditions de pH. Il n'y a donc pas à priori de compétition entre les 3 mycotoxines dans les conditions réactionnelles utilisées. Au contraire, dans certains cas, l'efficacité est augmentée quand les mycotoxines sont en mélange.

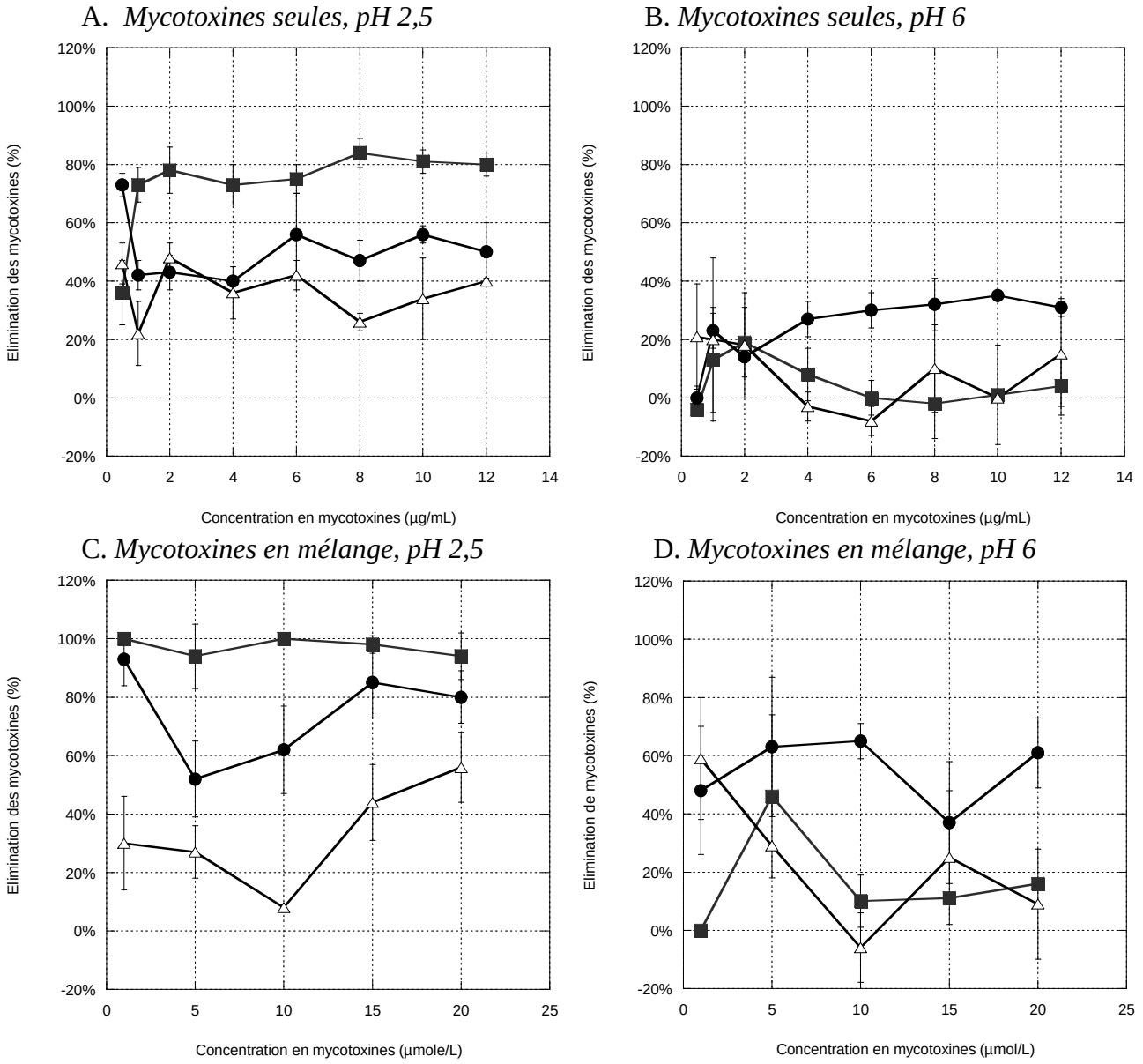


Figure 46 : Pourcentage d'élimination des mycotoxines OTA (■), ZEA (●) et FB1 (△) par des spores inactivées d'*A. japonicus* Mu541 (10^7 spores/mL) dans du tampon phosphate-citrate (0,05M). L'adsorption a été effectuée à pH 2,5 (A, C) et pH 6 (B, D). Les mycotoxines ont été placées dans le tampon soient seules (A, B) soit en mélange (C, D).

VI Comparaison avec d'autres adsorbants commerciaux

L'efficacité d'adsorption des spores d'*A. japonicus* sur l'OTA et la ZEA a été comparée à celle d'adsorbants commerciaux existants, à savoir du charbon activé (Carbovet®), un adsorbant à base de parois de levure (MTB-100®) et une zéolithe (en développement chez Evialis) (cf Figure 47 et Figure 48).

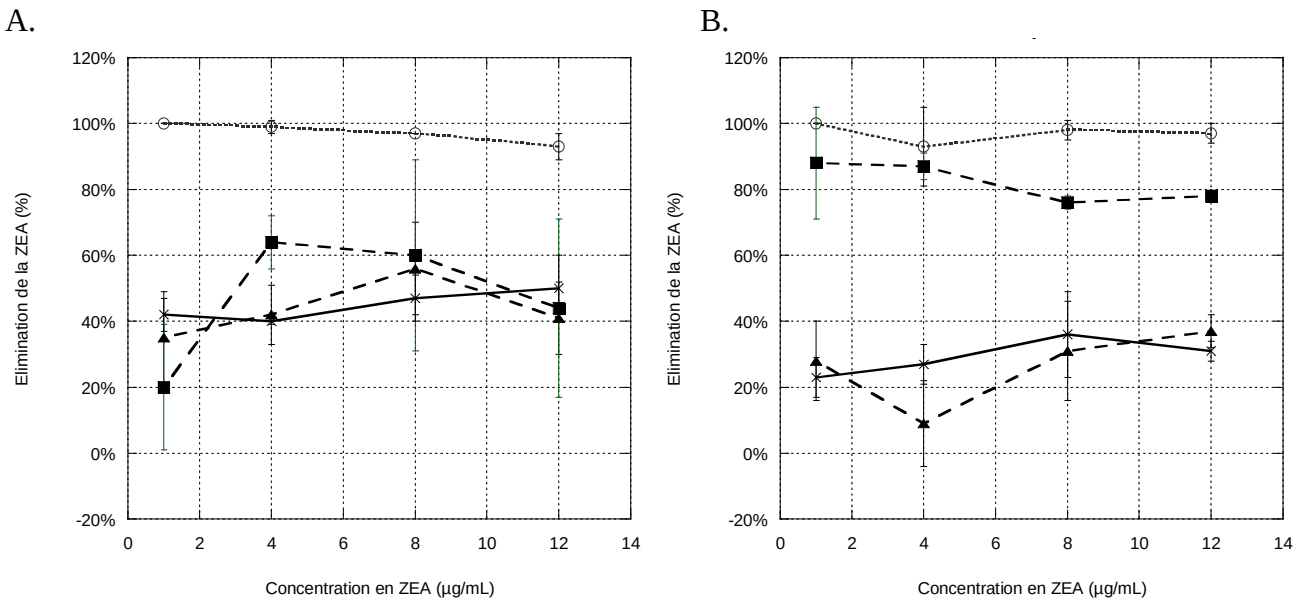


Figure 47 : Pourcentage d'élimination de la ZEA par différents adsorbants commerciaux (Charbon actif Carbovet®: ⊖, Zéolithe A : ▲, MTB-100® : ■, Spores inactivée Mu541 : ×) dans du tampon phosphate-citrate (0,05M). L'adsorption a été effectuée à pH 2,5 (A) et pH 6 (B).

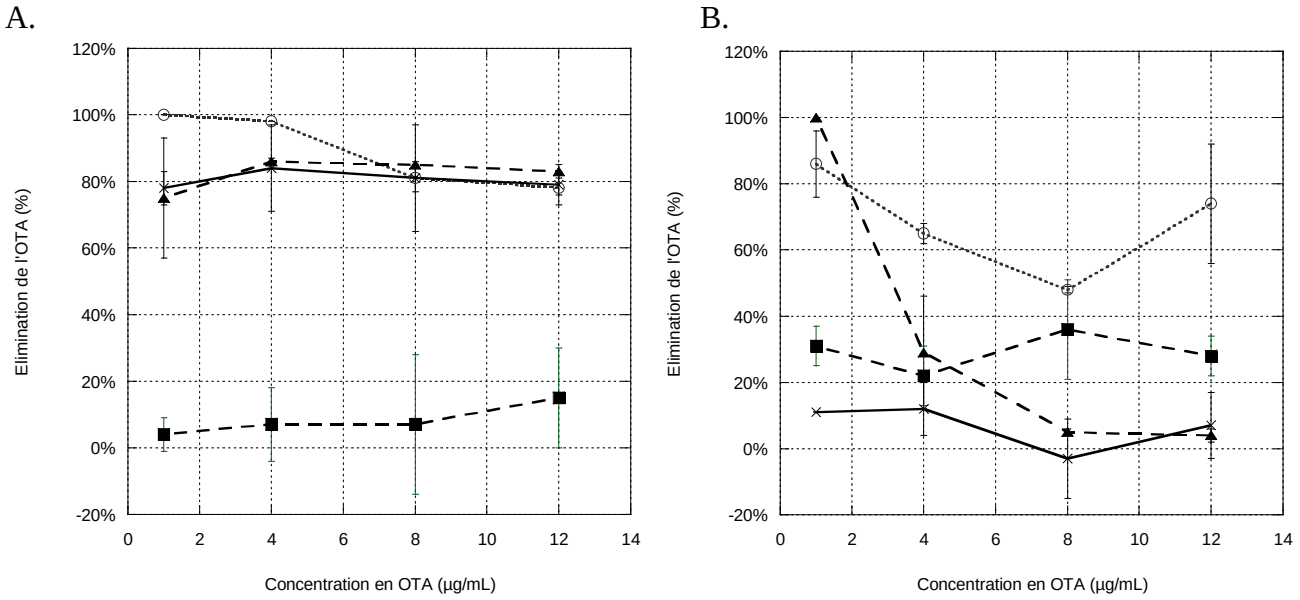


Figure 48 : Pourcentage d'élimination de l'OTA par différents adsorbants commerciaux (Charbon actif Carbovet®: ⊖, Zéolithe A : ▲, MTB-100® : ■, Spores inactivée Mu541 : ×) dans du tampon phosphate-citrate (0,05M). L'adsorption a été effectuée à pH 2,5 (A) et pH 6 (B).

Le charbon activé est l'adsorbant le plus efficace parmi ceux testés à la fois pour l'OTA et la ZEA, et ce aux 2 pHs étudiés. En ce qui concerne la ZEA, le MTB-100 est assez efficace surtout à pH 6. A pH 2,5, les spores sont aussi efficaces que le MTB-100 et que la zéolithe A. Par contre, à pH 6, les spores comme la zéolithe A sont peu efficaces. Pour l'OTA, à pH 2,5, le charbon activé, MTB-100 et les spores ont une très bonne efficacité d'adsorption. A pH 6, seul le charbon activé est efficace contre l'OTA.

VII **Discussion**

Nous avons montré que de la ZEA initialement présente à 1 µg/mL peut être éliminée instantanément d'un tampon phosphate-citrate (0,05M, pH 6) en y ajoutant des spores. Cette élimination correspond bien à une adsorption de la ZEA sur les spores puisque d'une part la ZEA adsorbée peut être retrouvée après une extraction au méthanol, et que d'autre part les spores inactivées sont aussi efficaces que les spores vivantes pour adsorber la ZEA. Il ne s'agit donc pas dans ce cas d'une transformation de la ZEA. La saturation des sites de fixation n'a pas été caractérisée car il est impossible d'augmenter de façon importante la concentration en ZEA initiale. En effet, celle-ci n'est pas très soluble dans l'eau (Lemke *et al.*, 1998).

Plus la concentration en spores augmente, plus l'adsorption de la ZEA est importante. Il serait donc intéressant d'adapter la concentration en spores au taux de contamination retrouvé dans les céréales. Les essais dans des conditions proches du réel sur du maïs naturellement contaminé n'ont pas été concluants étant donné l'impossibilité de séparer les spores du milieu contaminé. En effet, il est impossible de déterminer si la ZEA dosée est directement extraite du maïs ou si elle a été adsorbée puis extraite ensuite. Ainsi, des expériences *in vivo* (dosages des teneurs dans les excréments) devront être menées pour conclure sur l'efficacité du procédé proposé sur des céréales naturellement contaminées.

Pour évaluer l'efficacité dans différentes conditions, l'influence du pH a été testée. Des conditions acides, correspondant aux conditions retrouvées dans l'estomac permettent une meilleure adsorption que des conditions de pH neutres ou alcalines. Les expériences effectuées en mimant les conditions dans un système digestif montrent que la ZEA adsorbée à pH acide peut se désorber à pH alcalin. D'autres études devront donc être menées *in vivo* pour savoir si le complexe ZEA/spores résistera aux variations de pH rencontrées pendant le passage dans un vrai sytème digestif et permettra d'éviter l'absorption de la ZEA. A un pH donné, le complexe spores/mycotoxines semble être stable étant donné la faible proportion de ZEA retrouvée dans le lavage à l'eau. Nous pouvons observer, dans ce cas, que plus le pH est alcalin, plus la ZEA est soluble mais moins la ZEA s'adsorbe sur les spores. La solubilité de la ZEA joue peut-être un rôle dans le phénomène d'adsorption comme cela a déjà été observé par Hamdaoui et Naffrechoux (2007) pour l'adsorption de phénols sur du charbon activé.

La modélisation de l'adsorption et la détermination des paramètres du modèle de Hill permettent de confirmer une meilleure adsorption à pH 2,5 qu'à pH 6. Cela peut être expliqué par une meilleure accessibilité de la ZEA pour les sites de fixation à pH 2,5 qu'à pH 6. La valeur du paramètre *n* du modèle de Hill montre un phénomène de coopérativité ($n>1$). L'adsorption à pH 2,5 montre une plus grande coopérativité que l'adsorption à pH 6 ($n_{pH\ 2.5} < n_{pH\ 6}$). A pH 6, la structure de composés de surface des spores ne permet peut être pas à la ZEA d'accéder facilement aux sites de fixation mais les premières molécules de ZEA fixées peuvent faciliter la fixation des molécules de ZEA suivantes, en ouvrant les structures et augmentant le nombre de sites de fixation accessibles. Ceci a également été observé par Yiannikouris (2004) pour l'adsorption de la ZEA sur des parois de levures modifiées composant du produit MTB-100.

D'autres mycotoxines sont capables de se fixer sur les spores comme l'OTA. Bejaoui *et al.* (2005) avait déjà montré que l'OTA pouvait se fixer aux spores d'*Aspergillus* de la section Nigri. Les auteurs avaient observé une élimination de 10% à 45% de l'OTA présente à une concentration de 2 µg/mL dans du jus de raisin, par 10^7 spores/mL à pH 4. Nous obtenons des valeurs du même ordre de grandeur. Le mélange de mycotoxines OTA, ZEA et FB1 ne semble pas diminuer de façon importante l'efficacité d'adsorption pour l'une ou l'autre des mycotoxines aux deux conditions de pH. Il n'y a donc pas de compétition de site de fixation en fonction des mycotoxines. Au contraire, dans certains cas, l'efficacité est augmentée quand les mycotoxines sont en mélange. Une synergie d'adsorption entre les mycotoxines est peut-être observée.

Les spores inactivées étant aussi efficaces que les spores vivantes, il est possible d'envisager un ajout de spores inactivées dans la ration alimentaire d'animaux comme adsorbant biologique. Les espèces d'*A. japonicus* ne produisant pas d'OTA, le risque de présence d'OTA sur les spores inactivées est nul. La comparaison de l'efficacité d'adsorption de la ZEA et de l'OTA avec d'autres adsorbants commerciaux nous a permis de situer le procédé dans le paysage commercial. Le charbon activé est l'adsorbant le plus efficace mais adsorbe de façon peu spécifique les nutriments essentiels (Huwig *et al.*, 2001) et les vitamines (Kadakal *et al.*, 2004). Pour la ZEA, MTB-100 semble être une bonne alternative au charbon activé. Pour l'OTA, à pH acide, les spores peuvent concurrencer les autres adsorbants. Les résultats obtenus dans notre étude pour l'adsorption de la ZEA sur MTB-100 sont surprenants par rapport aux résultats obtenus par Yiannikouris (2004) où une adsorption plus efficace à pH 3 qu'à pH 6 a été observée. Döll *et al.* (2005) ont testé differents adsorbants commerciaux pour leur capacité à adsorber la ZEA. A pH acide, l'adsorption par MTB-100 est moins efficace qu'à pH neutre. Cette étude est conforme avec ce que l'on observe. Il aurait été intéressant de modéliser les résultats pour obtenir les paramètres d'adsorption des différents adsorbants. Cependant, le nombre de points expérimentaux était trop faible pour avoir une modélisation précise. Le modèle de Hill était, malgré tout, le modèle qui correspondait le mieux pour tous les adsorbants. Un mélange d'adsorbants peut être envisagé comme un mélange spores/parois de levure pour une efficacité optimale. La présence des spores dans ce mélange pourrait palier au manque d'efficacité d'adsorption de l'OTA à pH acide sur les parois de levure.

Chapitre 2 : Caractérisation de l'interaction mycotoxines/spores

I Analyse de la surface des spores

I.1 Observation microscopique de la surface des spores

Les spores, d'un diamètre d'environ 4 µm, ont une structure extérieure très repliée offrant une surface de contact très importante (cf Figure 49).

A. B.

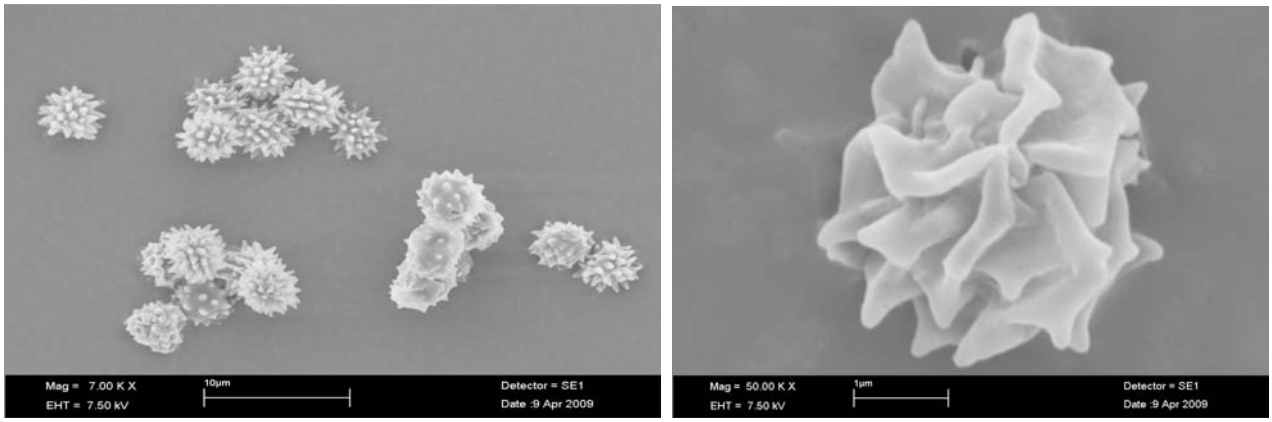


Figure 49 : Photographie de spores d'*A. japonicus* Mu541 inactivées à la chaleur, grossies au microscope à balayage électronique (A. X7000, B. X50000).

I.2 Analyse chimique globale de la surface des spores

La détermination globale des composés chimiques en surface des spores a été évaluée par une analyse ESCA. L'aire des pics correspondant aux électrons des atomes d'oxygène et d'azote a été calculée et rapportée à l'aire totale des pics de carbone (cf Tableau 37).

Tableau 37 : Ratio atomique des éléments trouvés dans le spectre ESCA par rapport au carbone total.

Atomes	Energie	Ratio atomique par rapport au C total
C	288,6 eV	1
O	532,2 eV	0,23
N	403,2 eV	0,1

Les composés de surface des spores possèdent pour 1 molécule de carbone, 0,23 molécule d'oxygène et 0,1 molécule d'azote soit environ 75% de carbone, 17% d'azote et 8% d'oxygène. Les électrons provenant des molécules d'hydrogène ont une énergie de liaison trop faible pour pouvoir être mesurée par cet appareil.

Le pic de carbone expérimental est ensuite décomposé en plusieurs pics correspondant à des carbones présents dans différents types de groupements chimiques (cf Tableau 38). La décomposition menant à une courbe la plus proche possible de celle expérimentale a été retenue.

Ceci a également été effectué pour l'oxygène (cf Tableau 39). Pour l'azote, l'intensité du pic étant plus faible, la décomposition du pic expérimental en pics secondaires a été plus délicate.

Tableau 38 : Ratio atomique des différents carbones par rapport au carbone.

Groupements chimiques	Energie	Ratio atomique par rapport au C total
C-C ; C-H	288 eV	0,48
C-N ; C-O-H ; C-O-C	289,3 eV	0,33
C=O	291,2 eV	0,15
-O-C=O | O	292,6 eV	0,04

Tableau 39 : Ratio atomique des différents oxygènes par rapport au carbone.

Groupements chimiques	Energie	Ratio atomique par rapport au C total
OH-C	530,4 eV	0,12
O=C	532,2 eV	0,11

Une forte proportion de carbones liés à un autre carbone ou à un hydrogène est observée.

L'interprétation du spectre ESCA peut permettre d'identifier la composition moléculaire de surface. Les principaux constituants de la paroi de spores de champignons sont des protéines, glucanes et lipides (Lewis, 1991 ; Rosenberg, 1976). Le ratio atomique N/C est directement lié à la proportion de protéines à la surface des spores. Les ratios C=O/C et C-N/C sont liés à la proportion de protéines et glucanes. Enfin, les ratios atomiques C-C/C et C-H/C sont liés à la proportion de protéines et lipides. Ainsi, il est possible, à partir des ratios observés, de déterminer la proportion des différents constituants (protéines, lipides, protéines) de la paroi des spores à partir de la formule chimique des différents constituants. Une telle opération a été entreprise chez des spores de *Phanerochaete chrysosporium* par Gerin *et al.* (1993). Les compositions chimiques des constituants modèles considérées pour la déduction de la composition de la surface des spores de *P. chrysosporium* sont présentées sur le Tableau 40.

Tableau 40 : Ratios atomiques pour les constituants modèles de la surface des spores (extrait de Gerin *et al.*, 1993).

Constituants	C-(C, H)/C (mol/mol)	C-(O,N)/C (mol/mol)	C=O/C (mol/mol)	N/C (mol/mol)	Concentration de carbone (mol/g)
Glucanes $(C_6H_{10}0_5)_n$		0,833	0,167		0,037
Lipides $(CH_2)_n$	1				0,071
Protéines (identifiées par la composition moyenne de protéines fongiques)	0,4	0 ,32	0,28	0,27	0,042

La proportion de carbone associée à chaque constituant (C_P : protéines, C_G : glucanes et C_L : lipides) par rapport au carbone total est alors déterminée en résolvant l'Équation 3.

Équation 3 : Système de 3 équations déterminant la composition chimique de constituants modèles par rapport à la composition moléculaire de surface établie par l'ESCA (à partir de Gerin *et al.*, 1993).

$$\frac{N}{C} = 0{,}27 \cdot \frac{C_P}{C}$$

$$\frac{C=O}{C} = 0{,}28 \cdot \frac{C_P}{C} + 0{,}167 \cdot \frac{C_G}{C}$$

$$\frac{C-C}{C} = 0{,}4 \cdot C_P + C_L$$

x/y correspond au ratio atomique de x sur y. Ca correspond au carbone contenu dans a.

Le pourcentage massique de composés à la surface des spores est alors évalué en prenant en compte la composition en carbone de chaque constituant modèle (dernière colonne du Tableau 40).

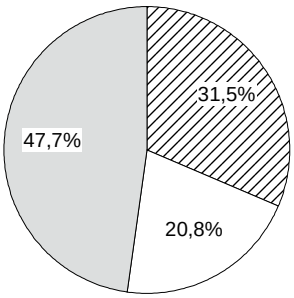


Figure 50 : Composition de surface (% massique) estimée à partir de l'analyse ESCA et selon le modèle établi par Gerin *et al.*, 1993. En gris sont représentés les lipides, en blanc les glucanes et en rayé les protéines.

47,7% des composés de surface peuvent être assimilés à des lipides, 31,5% à des protéines et 20,8% à des glucanes (cf Figure 50). Les peptidoglycanes, la chitine (N-glucosamine) et la mélanine, composés présents à la surface des spores ne sont pas pris en compte dans ce modèle mais sont à l'interface de plusieurs familles.

I.3 Hydrophobicité de la surface des spores

Deux techniques ont été utilisées pour déterminer l'hydrophobicité de surface des spores inactivées à la chaleur, le BATH test et la mesure d'angle de contact. Concernant la première expérimentation, 96,4 % des spores mises en contact avec une phase hexane se retrouvent dans cette phase. Les spores sont donc beaucoup plus attirées par la phase organique que par la phase aqueuse. La mesure de l'angle de contact donne quant à elle une valeur pour les spores de 135,6° (cf Figure 51), ce qui indique une surface très peu mouillable par de l'eau. Dans les 2 cas, les résultats obtenus montrent donc une très grande hydrophobicité de surface des spores (cf Tableau 41).

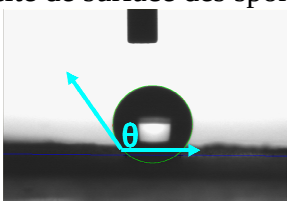


Figure 51 : Angle de contact obtenu par une goutte d'eau sur une surface remplie de spores.

Tableau 41 : Mesures d'hydrophobicité de la surface des spores par BATH test et mesure d'angle de contact.

BATH Test	Angle de contact
96,4% ± 2,4%	135,6° ± 7,6°
96,4% ± 2,4%	135,6° ± 7,6°

Comparativement, les hydrophobicités de surface des adsorbants commerciaux utilisés dans le Chapitre 1 sont présentées sur le Tableau 42. Seule la zéolithe a une surface hydrophile.

Tableau 42 : Hydrophobicité des adsorbants commerciaux.

Adsorbants	Angle de contact
Charbon activé	103,7° ± 5,8°
MTB-100	88,1° ± 9,1°
Zéolithe A	<5°

I.4 Charge de surface des spores

La surface des spores inactivées d'*A. japonicus* Mu541 a un potentiel zéta moyen à pH 2,5 de -4,52 mV ± 0,52 mV et de -13,57 mV ± 0,31 mV à pH 6 (cf Figure 52). La surface est donc faiblement chargée négativement à pH 2 et chargé négativement à pH 6.

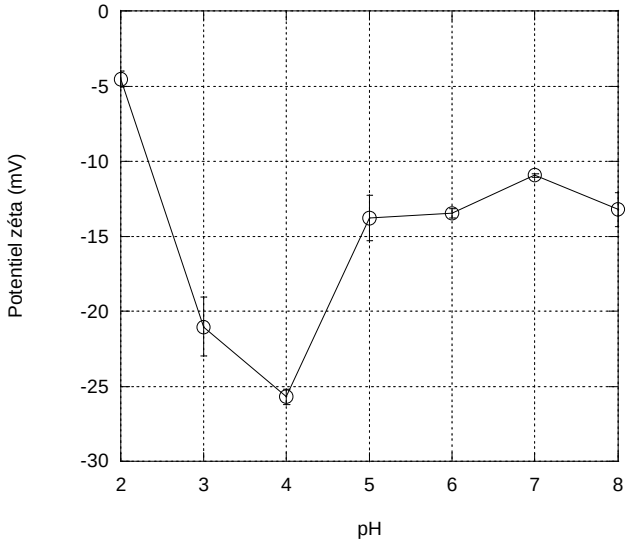


Figure 52 : Potentiel zéta de la surface des spores pour différents pH (tampon phosphate-citrate, 0,05M).

Les spores ont subi différents traitements de surface, comme l'ajout de SDS, ou d'urée, ou d'acide chlorhydrique. Des mesures d'hydrophobicité et de potentiel zéta ont ensuite été effectuées, et l'efficacité d'adsorption vis-à-vis de la ZEA a également été testée (cf Tableau 43).

Tableau 43 : Caractéristiques de surface des spores inactivées à la chaleur, inactivées à l'acide chlorhyrique et pour différents traitements de surface utilisés et efficacité d'adsorption associée.

	Hydrophobicité		Charge de surface	
Traitements	BATH Test	Angle de contact	Potentiel zéta à pH 2,5	Efficacité d'adsorption (ZEA)
Inactivées à la chaleur	96,4% ± 2,4%	135,6° ± 7,6°	-2,3 mV ± 1,7 mV	93% ± 9%
+ SDS (1%)	99,8% ± 0,1%	136,2° ± 1,7°	-17,8 mV ± 0,7 mV	88% ± 10%
+ Urée (8M)	99,8% ± 1,1%	136,2°± 4,7°	0,8 mV ± 3,8 mV	86% ± 12%
Inactivées à l'HCl (2N)	30,4% ± 12,3%	135,1°± 3,1°	17,9 mV ± 1,4 mV	83% ± 18%

Les traîtements appliqués ne modifient pas l'hydrophobicité de surface, excepté le traîtement à l'acide qui diminue uniquement la capacité des spores à migrer vers la phase organique. La charge de surface est par contre différente en fonction des différents traitements subis. L'efficacité d'adsorption des spores est similaire quelque soit le traitement.

II Discussion

Afin de mieux comprendre l'interaction ZEA/spores, la surface des spores a été analysée (aspect, composition chimique, hydrophobicité, charge de surface). Les conclusions de ces analyses sont une forte hydrophobicité de surface, une composition de celle-ci riche en lipides et une charge faiblement négative à pH acide où l'adsorption est la plus importante. Toutes ces observations suggèrent une interaction spores/mycotoxines de nature principalement hydrophobe. Une inactivation à la chaleur dans des conditions plus drastiques (durée plus longue ou température plus élevée) permet d'augmenter l'efficacité d'adsorption. Une destruction partielle de la surface des spores modifie peut-être la structure et permet une meilleure accessibilité de la ZEA aux sites de fixation. El-Nezami *et al.* (1998, 2002) et Niderkorn *et al.* (2006) ont également montré une meilleure efficacité de l'adsorption de la ZEA sur des bactéries lactiques par traitement des bactéries à l'acide chlorhydrique (2N) ou à la chaleur (1h dans de l'eau bouillante).

La forte hydrophobicité de la surface des spores a également été montré par Dague *et al.* (2008) sur des spores d'*A. fumigatus*. La proportion importante de mélanine à la surface des spores noires peut également être impliquée dans le phénomène (cf Figure 53). En effet, chez les spores d'*A. nidulans*, la mélanine est retrouvée en aussi grande quantité que les protéines de surface (Claverie-Martin *et al.*, 1986, Pihet *et al.*, 2009). Il serait intéressant de tester l'efficacité de spores d'autres types de moisissures (non noires) pour voir si la mélanine a un effet sur l'efficacité d'adsorption. Une comparaison de surfaces entre des spores capables d'adsorber les mycotoxines et des spores inefficaces aurait pu permettre de comprendre plus finement le phénomène.

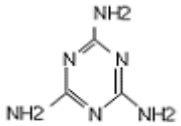


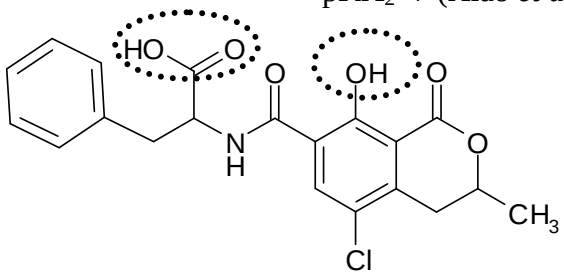
Figure 53 : Structure chimique de la mélanine.

Les spores ont ensuite été soumises à différents traitements de surface afin de modifier la charge de celle-ci, et d'en voir l'influence sur l'efficacité d'adsorption. Les traîtements au SDS et à l'acide chlorhydrique modifient effectivement cette charge de surface. Le SDS se fixe certainement sur la surface des spores par sa chaîne carbonée et créé de nouvelles charges négatives à la surface des spores. Le traitement à l'acide protonne la surface et la rend chargée positivement. C'est d'ailleurs sûrement pour cela que l'hydrophobicité des spores traitées à l'acide mesurée par le BATH test est plus faible que celle mesurée par angle de contact car la présence de protons à la surface permet une meilleure suspension des spores dans la phase aqueuse. Ce changement de charge de surface par traitement à l'acide chlorhydrique ou au SDS ne modifie pas de façon significative l'efficacité d'adsorption de la ZEA sur les spores. Ainsi, on peut penser que la charge de surface de la spore ne joue pas un grand rôle dans le phénomène d'adsorption. Ceci est également confirmé par le profil de potentiel zéta qui n'est pas exactement corrélé avec l'efficacité d'adsorption en fonction du pH. Le fait que la ZEA fixée sur les spores puisse être désorbée par du méthanol (solvant plutôt apolaire) va également dans le sens d'interactions hydrophobes.

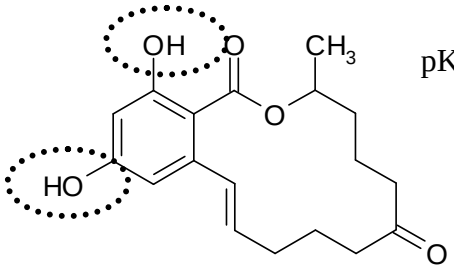
Par contre, les charges des mycotoxines ont sûrement un impact étant donné l'influence du pH observée sur l'adsorption entre la ZEA et les spores, bien que les interactions entre les 2 partenaires ne semblent donc pas être de nature ionique. Ceci peut être confirmé par l'étude de l'adsorption des trois mycotoxines (ZEA, OTA et FB1) sur des spores inactivées d'*A. japonicus* Mu541 (cf Chapitre 1). En effet, ces 3 mycotoxines ont des caractéristiques différentes en fonction des 2 pHs testés pouvant expliquer les différences d'adsorption. Certaines propriétés physico-chimiques des mycotoxines, comme leur polarité, leur solubilité, ou leurs constantes de dissociation, peuvent jouer un rôle prépondérant dans l'adsorption, tout en étant dépendantes du pH (cf Figure

54). Par exemple, la proportion de groupements ionisés portés par les mycotoxines varie en fonction du pH, ce qui va modifier le caractère hydrophobe des molécules (cf Figure 55).

A. pKA_1=3,5 (Zhou et Lai, 2004) pKA_2=7 (Xiao *et al.*, 1996)

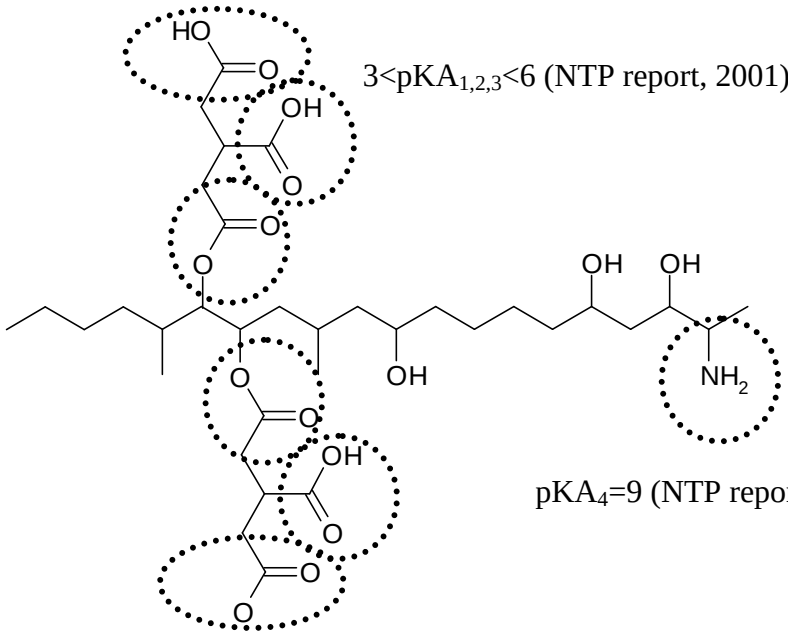


B.



$pKA_{1,2}$=7,62 (Lemke *et al.*, 1998)

C.



3<$pKA_{1,2,3}$<6 (NTP report, 2001)

pKA_4=9 (NTP report, 2001)

Figure 54 : Structures chimiques et pKa des 3 mycotoxines étudiées (A. OTA, B. ZEA, C. FB1), de l'urée et du SDS.

	pH 2,5		**pH 6** pH 7	
OTA	COOH/OH	COO^-/OH		COO^-/O^-
ZEA	OH	OH		O^-
FB1	COOH/NH_3^+	COO^-/NH_3^+		

Figure 55 : Formes ioniques des groupements ionisables de l'OTA, la ZEA et la FB1.

A pH 6, les mycotoxines sont plus ionisées (plus polaires et moins hydrophobes) qu'à pH 2,5, et l'efficacité d'adsorption est plus faible. Il semblerait donc que l'interaction spores/mycotoxines soit influencée par l'aspect hydrophobe des mycotoxines. De plus, à pH 6, la surface des spores est plus chargée négativement qu'à pH 2,5. Il est possible qu'un phénomène de répulsion s'ajoute à la baisse d'hydrophobicité des molécules. En outre, la FB1 est la molécule la moins hydrophobe et elle est très faiblement adsorbée par les spores. De manière générale, l'ordre d'efficacité d'adsorption des mycotoxines à pH 2,5 et à pH 6 peut être expliqué par leur état d'ionisation. Par exemple, l'OTA est la molécule la moins polaire et la plus adsorbée à pH 2,5 alors que la FB1 est la molécule la plus polaire et la moins adsorbée. A pH 2,5 et à pH 6, l'aspect ionique de la ZEA n'est pas modifié et son adsorption non plus. Par contre, l'aspect ionique de l'OTA varie du pH 2,5 au pH 6 et son adsorption également.

Ce sont donc principalement des interactions hydrophobes qui interviennent dans l'adsorption des mycotoxines sur les spores. Ceci avait été déjà suggéré dans d'autres cas de liaisons entre des mycotoxines et d'autres adsorbants (zéolithe : Daković *et al.*, 2005 ; bactéries lactiques : El-Nezami *et al.*, 2004, Haskard *et al.*, 2001). L'ordre d'efficacité d'adsorption des mycotoxines observé pour cette étude est le même que pour l'adsorption avec des bactéries lactiques (Niderkorn *et al.*, 2006). Les mêmes phénomènes sont donc peut être impliqués.

Le charbon activé et les parois de levure possèdent également des surfaces très hydrophobes Le phénomène d'adsorption de l'OTA et de la ZEA, pour le charbon activé, MTB-100 est sûrement également du à des interactions hydrophobes. En effet, le charbon activé peut être composé jusqu'à 95% de composés hydrocarbonés à sa surface (Dabrowski *et al.*, 2005) ce qui lui confère un caractère très hydrophobe. De plus, le greffage d'un composé organique hydrophobe (ODMBA) sur une zéolithe a permis de mettre en évidence l'importance des interactions hydrophobes dans l'adsorption de la ZEA et de l'OTA (Daković *et al.*, 2005). Des études effectuées sur d'autres types d'adsorbants insistent sur l'importance des interactions hydrophobes dans l'adsorption de la ZEA. Par exemple, Haskard *et al.* (2000) et El-Nezami *et al.* (2004) ont testé différents traitements de surface pour mieux comprendre l'interaction entre des bactéries lactiques et la ZEA. Les auteurs suggèrent la présence d'interactions hydrophobes entre la ZEA et la surface des bactéries car un traitement à l'urée, agent anti-hydrophobe, baisse l'efficacité d'adsorption. Des traitements à la chaleur et à l'acide augmentent l'efficacité. L'hypothèse formulée ici est une lyse des protéines par l'acide laissant place à des groupements hydrophobes plus nombreux en surface.

En ce qui concerne les parois de levures, Yiannikouris *et al.* (2004) ont identifié les composés impliqués dans l'adsorption de la ZEA sur les parois de levure comme étant des β-glucanes. Or, la surface des spores d'*A. niger* est composée de 2 types de sucres complexes liés entre eux : la chitine et les β-glucanes (Feofilova *et al.*, 2006). Ainsi, le phénomène d'adsorption de la ZEA sur des spores d'*Aspergillus* de la section Nigri peut éventuellement faire intervenir aussi des β-glucanes. D'autres composés sont sûrement également impliqués dans l'adsorption des mycotoxines sur les spores à savoir les hydrophobines. Ces protéines hydrophobes sont retrouvées à la surface des spores d'*A. fumigatus* par exemple (Paris *et al.*, 2003) et semblent être responsables de l'adsorption des spores sur des surfaces (Dague *et al.*, 2008). On peut donc imaginer que de telles molécules peuvent également être impliquées dans l'adsorption avec les mycotoxines grâce à des interactions hydrophobes. Il serait alors intéressant d'extraire ces hydrophobines et de tester leur efficacité d'adsorption des mycotoxines. Une fois les composés de la surface des spores impliqués dans l'adsorption déterminés, il serait nécessaire de les tester séparément. Un nouveau produit adsorbant contenant ces composés pourrait alors être développé. Les limites liées à l'utilisation de spores de moisissures comme adsorbant (allergies, mauvaise image pour le consommateur) seraient ainsi dépassées. Cependant, il est possible que cette capacité d'adsorption soit perdue après extraction. En effet, la structure poreuse des spores joue peut-être un rôle sur l'adsorption.

Chapitre 3 : Mise en évidence de l'élimination de la zéaralénone par des souches d'*Aspergillus* de la section Nigri

I Criblage de souches sur leur capacité à éliminer la zéaralénone

Plusieurs isolats d'*Aspergillus* et de *Streptomyces* ont été testés sur leur capacité à éliminer la ZEA présente dans leur milieu de croissance (à une concentration de 50 µg/mL pour les *Aspergillus* et de 10 µg/mL pour les *Streptomyces*), durant une incubation de 7 jours sous agitation et à 28°C. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 56.

La plupart des isolats sont capables d'éliminer la ZEA du milieu de culture : 10 isolats sur 18 éliminent plus de 50% de la ZEA présente. Parmi les espèces d'*Aspergillus, A. niger* élimine la ZEA de manière plus importante (entre 72% et 94% d'élimination de la ZEA en moyenne), puis *A. carbonarius* (47% et 70% d'élimination de la ZEA en moyenne) et enfin *A. japonicus* (21% à 34% d'élimination de la ZEA en moyenne). Parmi les espèces de *Streptomyces*, 5 isolats sur 8 sont capables d'éliminer la ZEA à plus de 92% en moyenne. La souche d'*A. niger* CA936 a été choisie parmi les souches les plus efficaces pour la suite des expériences. En effet, un criblage préliminaire faisait ressortir cette souche comme la plus efficace a influencé ce choix. Nous avons choisi un représentant de la famille des *Aspergillus* de la section Nigri car aucun produit potentiel de transformation n'a été observé pour les espèces de *Streptomyces*. Le but du criblage présenté ici n'était pas de comparer l'élimination des souches entre elles, mais d'évaluer la capcité d'élimination de ces différentes souches. C'est pourquoi l'élimination n'a pas été calculée par rapport à la croissance du micro-organisme considéré.

II Cinétiques d'élimination

Des cinétiques d'élimination de la ZEA ont été effectuées sur la souche d'*A. niger* CA936. Celle-ci est cultivée à 28°C sous agitation pendant au maximum 96h, dans du milieu de culture contaminé par de la ZEA de 1 µg/mL. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 57. Pour la concentration de 1 µg/mL, un lissage de la courbe a été effectué et la vitesse d'élimination (dérivée) a été calculée (cf Figure 58. B).

Une élimination totale de la ZEA a été observée après 48h d'incubation (cf Figure 57) et la vitesse d'élimination maximum est aux alentours de 24h d'incubation.

Une cinétique plus poussée sur 12 jours a été menée (cf Figure 58). Au bout de 9 jours, l'élimination de la ZEA n'est plus observée. Pour comprendre le phénomène, nous nous sommes focalisés sur la première phase de l'élimination.

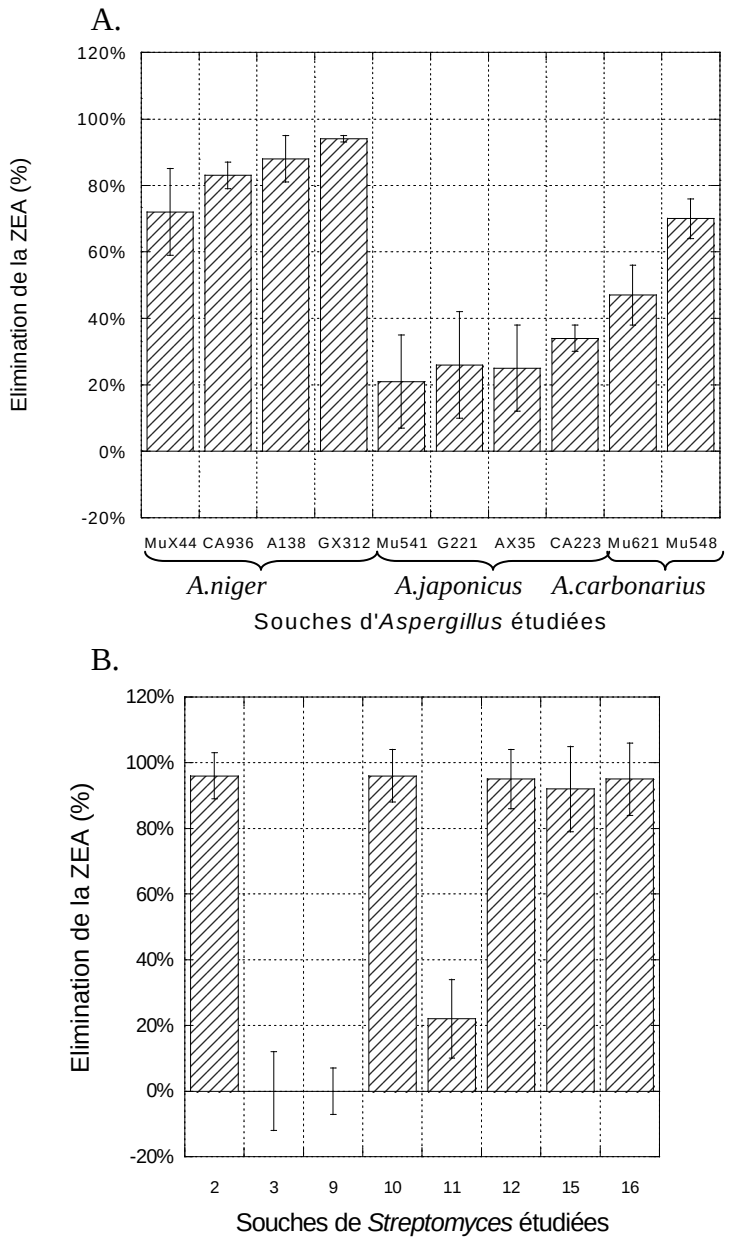


Figure 56 : Criblage de souches (A. *Aspergillus* de la section Nigri, B. *Streptomyces*) en croissance sur leur capacité à éliminer la ZEA du milieu de culture.

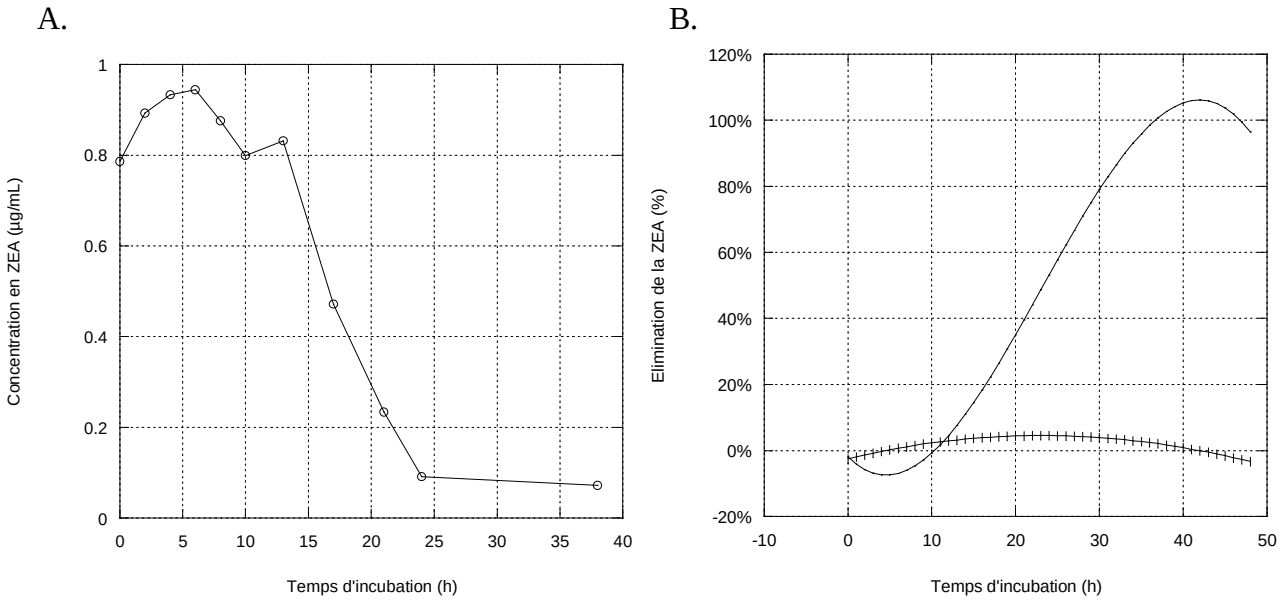


Figure 57 : Concentration en ZEA en fonction du temps d'incubation (A.) et cinétique d'élimination de la ZEA (µg/mL) par l'isolat d'*A. niger* CA936 en croissance sur du milieu contaminé par de la ZEA à 1 µg/mL (-) et vitesse d'élimination de la ZEA (+) (B.).

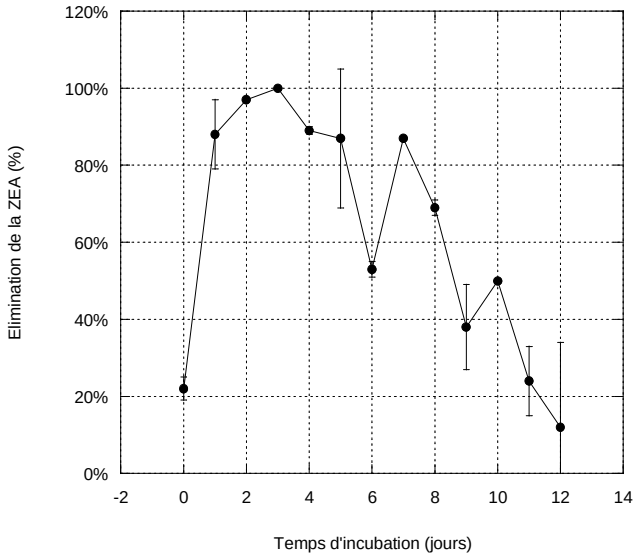


Figure 58 : Cinétique d'élimination de la ZEA sur 12 jours par l'isolat d'*A. niger* CA936 en croissance sur du milieu contaminé par de la ZEA à 1 µg/mL.

III Essais de caractérisation de l'activité enzymatique chez l'isolat *A. niger* CA936

III.1 Etudes préliminaires sur l'activité de dégradation de la ZEA

III.1.1 Localisation de l'élimination de la ZEA

Les potentiels de dégradation de la ZEA par du mycélium en croissance, par des cellules entières, par du milieu extracellulaire, ou par du mycélium inactivé par la chaleur, ont été déterminés en les mettant en présence de ZEA à une concentration de 1 µg/mL, et en dosant la ZEA résiduelle après 24h d'incubation à 28°C. La méthode des cellules entières consiste à incuber le mycélium avec la ZEA dans un tampon phosphate-citrate à pH 6. Le mycélium conserve ainsi son activité enzymatique mais ne croît pas. Ceci permet de déterminer si l'élimination observée plus haut est due au changement de milieu en relation avec la croissance des moisissures, ou à une réelle activité enzymatique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 44.

Tableau 44 : Pourcentage d'élimination de la ZEA par les cellules entières, le milieu extracellulaire, le mycélium inactivé à la chaleur et le mycélium en croissance d'*A. niger* CA936.

Cellules entières	Milieu extracellulaire	Mycélium inactivé par la chaleur	Mycélium en croissance
Entre 20% et 80% selon les essais	0	13% ± 3%	84% ± 10%

Le milieu extracellulaire n'a pas la capacité d'éliminer la ZEA. Nous n'avons donc pas affaire à une activité enzymatique extracellulaire. Le mycélium inactivé par la chaleur peut éliminer en moyenne 13% de la ZEA présente. Ceci doit correspondre à la part de ZEA adsorbée sur le mycélium, et donc non transformée. L'isolat d'*A. niger* en cellules entières est capable d'éliminer la ZEA. L'activité d'élimination semble donc être une activité enzymatique intracellulaire. Cependant, le pourcentage d'élimination de la ZEA en cellules entières était très variable selon les essais.

III.1.2 Preuve d'une activité enzymatique

III.1.2.1 Ajout de ZEA après élimination

Afin de prouver que nous n'avons pas affaire à un artefact, la souche CA936 a été incubée en présence de ZEA durant 48h. Après élimination, une concentration de ZEA identique à celle initiale (avant culture) a ensuite été ajoutée juste avant analyse. La quantité de ZEA dosée, dans ce cas, est beaucoup plus forte que celle observée après simple culture dans un milieu contaminé par la ZEA (sans ajout postérieur). C'est donc bien la croissance des moisissures qui provoque l'élimination de la ZEA (et non pas un artefact de dosage dû à la modification de la composition du milieu après croissance des moisissures).

III.1.2.2 Essai d'élimination avec mycélium inactivé

Des essais d'élimination de la ZEA ont été effectués avec du mycélium inactivé à la chaleur. Aucune élimination n'est observée. Cette dernière nécessite donc une activité métabolique du mycélium.

III.1.2.3 Extraction méthanolique du mycélium après élimination

Afin de déterminer si la ZEA n'est pas piégée par le mycélium en croissance, la souche CA936 a été incubée pendant 24h à 28°C en présence de ZEA. Du méthanol est ensuite ajouté comme à l'habitude, et le mycélium est séparé du milieu. La ZEA résiduelle est alors dosée dans le filtrat (eau + méthanol). Le mycélium seul est ensuite extrait une deuxième fois avec du méthanol sous agitation violente avec des billes. La ZEA est à nouveau dosée dans cet extrait : 72% de la ZEA présente au départ n'est retrouvée ni dans le filtrat ni dans l'extrait obtenu après agitation violente. L'extraction méthanolique du mycélium seul ne permet pratiquement pas de récupérer la ZEA éliminée (seul 2% de la ZEA est récupérée par cette extraction). La ZEA est donc bien transformée, et non pas piégée par le mycélium.

III.2 Tests de transformation de la ZEA par des fractions purifiées

Nous avons tenté de purifier de façon sommaire l'activité enzymatique impliquée, en testant la transformation de la ZEA par de l'extrait brut, ou par fractions protéiques obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium.

III.2.1 Essai de transformation de la ZEA par l'extrait brut

Un broyeur à bille de type Dangoumeau a permis d'obtenir un extrait brut à partir de 10g de mycélium. Les échantillons préalablement congelés dans l'azote liquide ont été broyés à -196 °C dans de l'azote liquide et resuspendu dans du tampon phosphate-citrate pH 6 avec du 1,4-Dithiothreitol (DTT) comme anti-oxydant. Trois temps de broyage ont été testés (1 min, 2 min, 3 min). La quantité totale de protéines obtenues a été dosée par la technique de Bradford. Les résultats sont présentés dans le Tableau 45.

Tableau 45 : Concentration en protéines intracellulaires et élimination de la ZEA par l'extrait brut en fonction de 3 temps de broyage.

Temps de broyage (min)	[protéines] mg/g de biomasse	Elimination de la ZEA en 24h (%)
1	18,4 ± 5,1	38% ± 11%
2	12,7 ± 3,5	24% ± 9%
3	9,5 ± 3,1	14% ± 7%

Pour tous les temps d'incubation, l'élimination de la ZEA par l'extrait brut est faible. Le rendement d'extraction, tant protéique qu'enzymatique, semble être le meilleur pour la durée de 1 minute. C'est ce temps qui sera retenu pour la suite.

III.2.1.1 Optimisation du tampon d'extraction

Pour essayer d'observer une activité de transformation de la ZEA plus importante dans l'extrait brut, différents tampons d'extraction ont été testés. Afin de protéger les enzymes intracellulaires, nous avons ajouté au tampon phosphate-citrate (0,05M), du glycérol (10%), du NaCl (0,1M), un anti-oxydant le DTT (0,5 mM), un cocktail commercial anti-protéases. Des ions métalliques ont aussi été ajoutés dans certains essais, en tant qu'éventuels cofacteurs ($MgCl_2$ 0,03M ; $ZnCl_2$ 0,01M ; $FeSO_4$ 10 mg/L ; $CuSO_4$ 5 mg/L, ATP 5 mM ; NADP 5 mM). L'activité enzymatique a été mesurée à deux temps d'incubation : 17h et 24h. Les essais effectués sont présentés sur le Tableau 46.

Tableau 46 : Différents essais effectués pour essayer d'optimiser le tampon d'extraction du milieu intracellulaire*.

Essai n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Conditions de base													
T°C incubation	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	40°C	
Tampon phosphate-citrate 0,05M	pH 5	pH 5	pH 5	pH 5	pH 5	pH 5	pH 5	pH 5	pH 7	pH 7	pH 9	pH 7	
Cryo-protecteur													
Glycérol 10%													
NaCl 0,1M													
Anti-oxydant													
DTT 0,5 mM													
Anti-protéase													
Cocktail anti-protéase (SIGMA)													
Co-facteurs éventuels													
$MgCl_2$ 0,03M													
$ZnCl_2$ 0,01M													
$FeSO_4$ 10 mg/L													
$CuSO_4$ 5 mg/L													
ATP 5 mM													
NADP 5 mM													

*Les cases en grisé correspondent à la présence des composés dans les différents essais.

Parmi ces 12 essais, aucun n'a permis d'augmenter l'activité de dégradation de la ZEA par rapport au tampon d'extraction phosphate-citrate pH 5 standard. La faible activité de dégradation dans l'extrait brut ne semble donc pas due à l'absence d'un de ces composés dans le tampon d'extraction.

III.2.2 Essais de transformation de la ZEA par des fractions protéiques intracellulaires

Nous avons donc décidé d'essayer de concentrer l'activité enzymatique pour espérer observer une élimination de la ZEA plus significative. Des fractions protéiques intracellulaires ont été obtenues par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium de l'extrait brut. L'activité totale d'élimination de la ZEA et les concentrations en protéines ont été comparées pour chacune des

fractions (cf Figure 59). L'activité spécifique de chaque fraction a également été déterminée (cf Tableau 47).

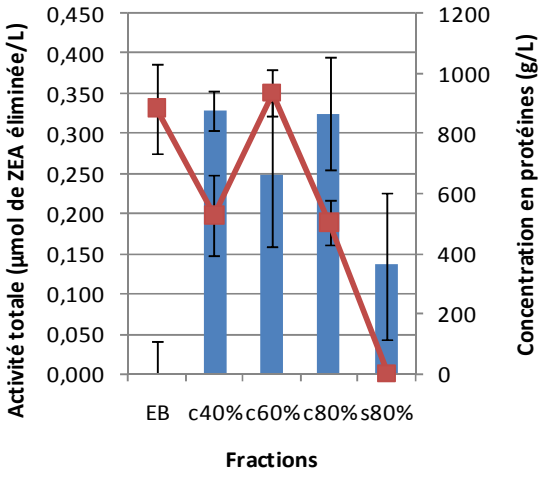


Figure 59 : Activité totale (µmol de ZEA éliminée/L) (histogramme bleu) et concentration en protéines (g/L) (ligne rouge) dans les différentes fractions étudiées. Les fractions protéiques ont été obtenues après fractionnement au sulfate d'ammonium (0-40%-60%-80%).

Tableau 47 : Activité spécifique (µmol de ZEA éliminée/g de protéines) obtenue pour différentes fractions protéiques intracellulaires.

Fractions protéiques étudiées	Activité spécifique (µmol de ZEA éliminée/g de protéines)
Extrait brut	$0 \pm 1{,}1.10^{-4}$
0-40%	$1{,}4.10^{-3} \pm 1{,}1.10^{-4}$
40%-60%	$6{,}4.10^{-4} \pm 5{,}9.10^{-4}$
60%-80%	$5{,}5.10^{-4} \pm 2{,}1.10^{-4}$
Surnageant 80%	$4{,}1.10^{-2} \pm 3{,}3.10^{-2}$

L'activité des fractions protéiques intracellulaires semble être plus importante que l'activité de l'extrait brut. Cependant, cette activité d'élimination de la ZEA demeure faible (de l'ordre de 0,3 µmol de ZEA/L) quelques que soient les fractions étudiées. Il n'y a pas eu réellement concentration des protéines lors de la précipitation et les activités spécifiques (µmol de ZEA éliminée/g de protéines) sont équivalentes pour les 3 fractions protéiques 0-40%, 40%-60% et 60%-80%. Pour le surnageant, le peu de protéines dosées entraîne une activité spécifique importante, modérée par une activité volumique très faible. Ces essais de fractionnement des protéines intracellulaires ne sont pas concluants.

III.3 Essais de transformation de la ZEA par du mycélium en croissance sur du milieu minéral

Un essai a été effectué pour déterminer si la souche d'*A. niger* CA936 est capable d'utiliser la ZEA comme seule source de carbone. Le milieu utilisé est un milieu synthétique optimisé pour la croissance des *A. niger* en enlevant la source de carbone (glucose) pour le remplacer par 200 µg/mL de ZEA. Ce milieu contient les éléments minéraux suivants : NH_4NO_3, K_2HPO_4, KCl, $MgSO_4$, $Na_2B_4O_7$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$. Le milieu a été inoculé par 0,1g de biomasse humide âgée de 24h dans 1 mL de milieu et incubés pendant 1 à 7 jours. Après ajout de

méthanol, à chaque prélèvement, la ZEA résiduelle a été dosée par HPLC et le spectre UV du mélange a été effectué.

Aucune transformation de la ZEA au bout de 6 jours d'incubation en milieu minéral n'a été observée. Ceci a été confirmé par les spectres UV obtenus et présentés sur la Figure 60: ils ne permettent pas de voir apparaître des pics d'absorbance autre que ceux de la ZEA.

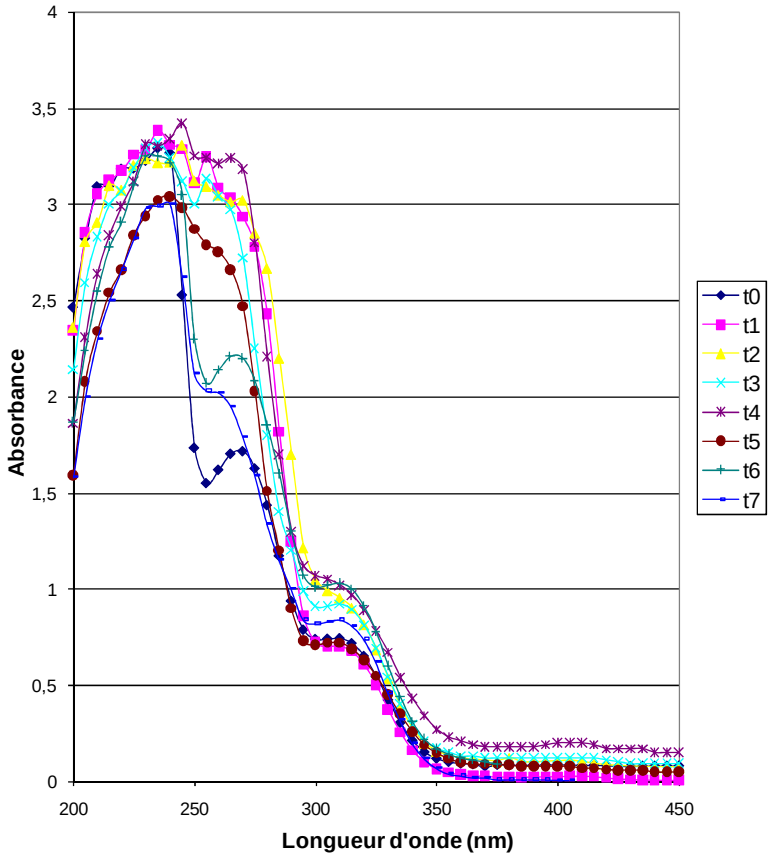


Figure 60: Spectre UV des cultures de l'isolat *A. niger* CA936 en milieu minéral

IV Discussion

Seize isolats parmi les dix-huit testés (*Aspergillus sp.* et *Streptomyces sp.*) ont la capacité d'éliminer la ZEA. Cette élimination est bien une transformation étant donné qu'une extraction drastique du mycélium ne permet pas de retrouver la ZEA initialement présente, donc pas de piégeage, et que le mycelium inactivé perd cette capacité. Les genres *Aspergillus* et *Streptomyces* sont connus pour posséder de fortes capacités métaboliques (Bodie *et al.*, 1994; Horinouchi *et al.*, 2007), et ce n'est donc pas surprenant que la majorité des isolats testés soient capables d'éliminer la ZEA. Les *Aspergillus* de la section Nigri ont été spécifiquement choisis pour le criblage car les spores de certaines de ces espèces sont capables également d'adsorber la ZEA et l'OTA. Nous nous sommes donc demandés s'ils étaiet également capables de transformer la ZEA.

Le mycélium inactivé par la chaleur peut éliminer en moyenne 13% de la ZEA présente. C'est la part de ZEA adsorbée sur le mycélium et non transformée. L'isolat d'*A. niger* en cellules entières est capable d'éliminer la ZEA. L'activité d'élimination semble donc être une activité enzymatique intracellulaire. Cependant, l'élimination de la ZEA en cellules entières était très variable selon les essais. Des essais ont été effectués pour une concentration en ZEA de 50 µg/mL mais aucun produit de transformation n'a été observé contrairement au mycélium en croissance.

L'élimination de la ZEA n'apparaît qu'à partir d'environ 10h d'incubation. Au contraire, pendant les dix premières heures d'incubation, la concentration en ZEA a tendance à augmenter. On peut supposer qu'une partie de la ZEA est adsorbée sur les spores et pendant l'étape de germination des spores, la ZEA est relarguée d'où une augmentation de la concentration en ZEA dans la première partie de la cinétique. En effet, les spores perdent leur caractère hydrophobe après germination (Dague *et al.*, 2008). Il ne peut donc plus y avoir adsorption et la ZEA adsorbée est relarguée dans le milieu. Atoui *et al.* (2007) ont également montré le même phénomène avec des spores d'*A. carbonarius* et l'OTA. L'OTA, fixée sur les spores, est relarguée dans le milieu lors de la germination. Dans notre cas, le mycélium transforme ensuite la ZEA jusqu'à 8 jours d'incubation. A partir du 9ème jour, l'élimination de la ZEA diminue. La transformation de la ZEA est peut-être réversible. Peut-être y a-t-il hydrolyse de la ZEA-sulfate du au changement de pH du milieu au cours du temps. Pour le savoir, il aurait été intéressant de mesurer le pH au cours du temps. Par la suite (cf Chapitre 4), nous avons démontré que la transformation menait à une ZEA-sulfate. Il est alors possible que la souche se retrouve en limitation de substrat et effectue la réaction inverse pour récupérer le groupement sulfate. Le génome d'une souche d'*A. niger* de référence (CBS 513.88) a d'ailleurs été séquencé (Pel *et al.*, 2007). En effectuant une recherche sur Uniprot, un gène correspond à une aryl-sulfotransférase et quatre gènes correspondent à des phénols sulfatases (EC 3.1.6.1) ont été mis en évidence. Il est donc probable que la souche étudiée ait le même bagage génétique et soit capable d'effectuer la réaction de sulfo-conjugaison et la réaction inverse.

L'élimination de la ZEA par l'isolat CA936 en cellules entières était très variable selon les essais. Il a donc été très difficile d'évaluer la transformation dans ces conditions. La transformation par l'extrait brut et les fractions protéiques n'a pas été réellement prouvée. Cependant, à ce stade de l'étude, nous ne savions pas à quelle transformation nous avions affaire. Il est donc possible que le milieu réactionnel lors des tests d'activité n'est pas été bien optimisé. En effet, par la suite, nous avons montré que la transformation de la ZEA menait à une sulfo-conjugaison. Pour cette transformation, du sulfate activé par de l'ATP est nécessaire. Il aurait donc été intéressant de le tester comme substrat dans les tests d'activité. Pour le moment, la transformation de la ZEA n'est significative que quand la souche est en croissance. C'est donc sûrement une métabolisation complexe de la ZEA qui est impliquée comme pour d'autres études précédentes (Molnar *et al.*, 2004 ; Schatzmayr *et al.*, 2008). Cependant, il semble difficile d'imaginer d'incorporer à l'aliment une souche vivante d'*A. niger* comme probiotique. En effet, il a été récemment découvert que des souches d'*A. niger* étaient capables de produire de la FB2 (Frisvad *et al.*, 2007). Nous avons vérifié l'absence de cette molécule dans le milieu de culture après incubation de la souche d'*A. niger* choisie. Même si la souche étudiée n'est ni productrice d'OTA dans les conditions testées par Bejaoui *et al.* (2005) ni de FB2, il ne sera pas possible d'incorporer directement la souche d'*A. niger* dans l'alimentation. Il faudra donc réussir à déterminer les enzymes impliquées et les purifier afin d'espérer pouvoir utilisé ce procédé tel quel dans l'industrie.

Le plus important, à ce niveau de l'étude, est d'identifier les produits de transformation et leur toxicité.

Chapitre 4 : Caractérisation du produit de transformation de la zéaralénone par des souches d'*Aspergillus* de la section Nigri

I Détection d'un produit de transformation

Pour essayer de détecter un produit de transformation de la ZEA, des cinétiques d'élimination ont été effectuées avec des concentrations initiales en ZEA croissantes (de 5 à 150 µg/mL). Les résultats sont présentés sur la Figure 61. Ceci a été effectué avec les souches d'*Aspergillus* de la section Nigri et d'actinomycètes. Cependant, pour les souches d'actinomycètes, à partir d'une concentration de 10 µg/mL, aucune élimination de la ZEA n'était observée. Nous nous sommes donc focalisés sur la souche d'*A. niger* CA936, sélectionnée à partir des résultats du Chapitre 3.

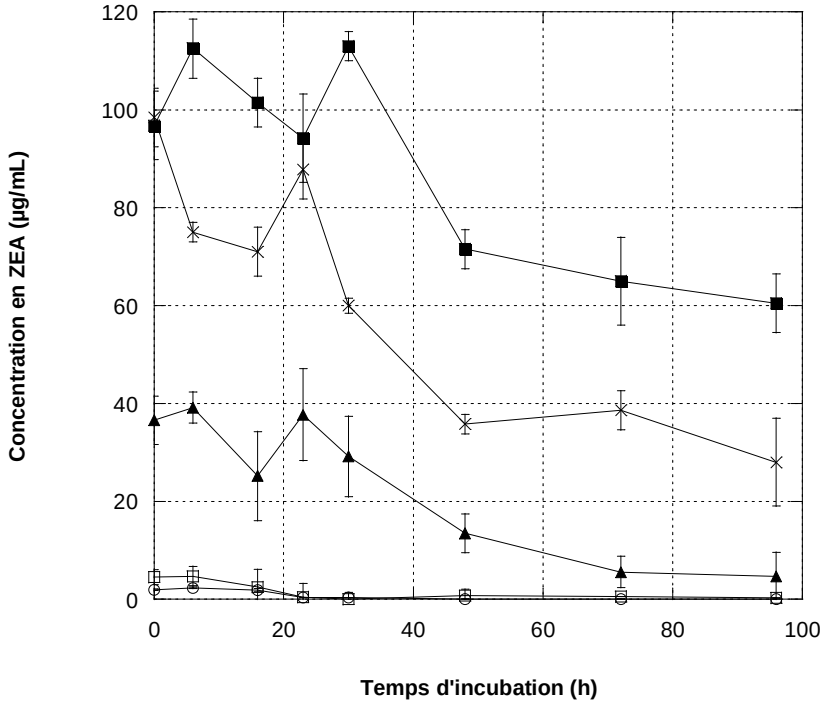


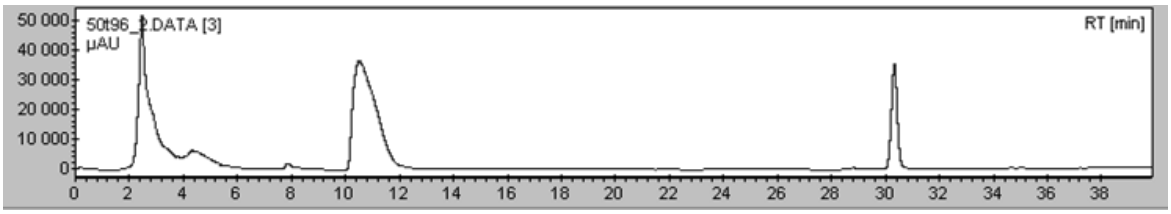
Figure 61 : Concentration de la ZEA à différents temps d'incubation de la souche d'*A. niger* CA936 en croissance sur du milieu contaminé par de la ZEA des concentrations de 5 µg/mL ( ), 10 µg/mL ( ), 50 µg/mL ( ), 100 µg/mL ( ) et 150 µg/mL ( ).

Pour chaque concentration testée, la ZEA a été éliminée. Pour des concentrations de ZEA initiales de 5 et 10 µg/mL, l'élimination totale de la ZEA est observée après 48h d'incubation. Pour des concentrations de ZEA initiales de 50, 100 et 150 µg/mL, l'élimination maximale de ZEA a été observée après 100h d'incubation avec respectivement 87%, 72% et 88% d'élimination de la ZEA.

Pour les concentrations initiales en ZEA supérieures ou égales à 50 µg/mL, pendant que l'aire du pic de ZEA diminue (30,2 min), un pic HPLC apparaît à 11 minutes (cf Figure 62A.). Le conjugué est plus polaire que la ZEA. Son aire augmente avec le temps d'incubation de la souche d'*A. niger* CA936 et avec la concentration initiale en ZEA. Son spectre UV (cf Figure 62B.) est similaire à celui de la ZEA (cf Figure 62C.) avec un décalage des maxima d'absorption. En effet, les absorptions maximales sont observées à 236 nm et 274 nm pour la ZEA alors qu'elles sont observées à 228 nm et 260 nm dans le produit inconnu. Le spectre UV du conjugué de la ZEA laisse supposer

la présence d'un groupement sulfate dans la molécule. En effet, un décalage de valeurs maximales d'absorption peut être attribué à la présence des électrons d'un groupement sulfate (Barron *et al.*, 1988).

A.



B.

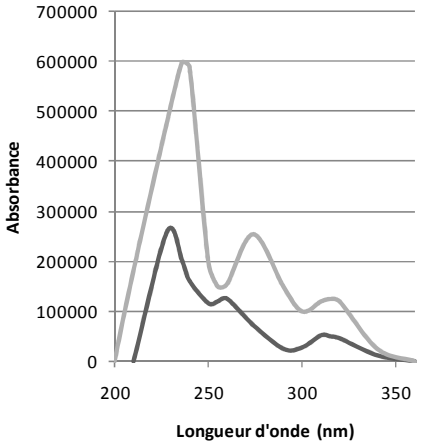


Figure 62 : Exemple de chromatogramme HPLC (Fluo: λex=275 nm; λem=450 nm) (A) et spectres UV correspondant au produit détecté, la ZEA-sulfate (trait noir) et ZEA (trait gris) (B) obtenue à partir de l'incubation de la souche d'*A. niger* CA936 en croissance sur du milieu contaminé par 150 µg/mL de ZEA.

II Détermination de la structure chimique du produit

II.1.1 Identification du produit de transformation

II.1.1.1 Analyse en HPLC/MS^n du mélange

Pour identifier le produit de transformation de la ZEA, le mélange incubé pendant 48h avec la souche CA936 dans un milieu contaminé par 50 µg/mL de ZEA a été analysé en HPLC/MS^n en mode d'ionisation négatif et positif. Les chromatogrammes obtenus dans les deux conditions sont présentés sur la Figure 63. Le courant ionique total (TIC) puis le courant d'ions extraits choisis (EIC) ont été mesurés. Pour l'acquisition en mode TIC, le pic à 11 minutes est bien retrouvé en mode d'ionisation positif et négatif. Pour une acquisition en EIC, le pic de la ZEA est observé (masse de 317 en mode d'ionisation négatif) ainsi que celui du produit (masse de 397 en mode d'ionisation négatif et 416 en mode d'ionisation positif). Le produit de transformation de la ZEA a une masse plus importante que la ZEA elle-même. Il s'agit donc probablement d'un conjugué de ZEA.

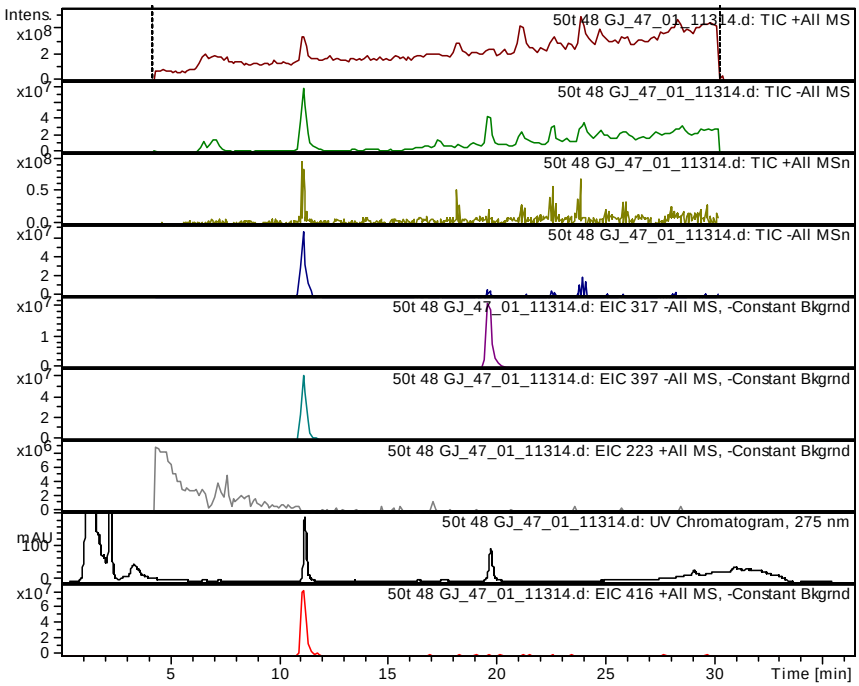


Figure 63 : Exemples de chromatogrammes obtenus par HPLC/MS^n dans différentes conditions d'ionisation.

II.1.1.2 Hydrolyse enzymatique du produit de transformation

Pour déterminer si le produit de transformation est un glucuro-conjugué ou un sulfo-conjugué (produits couremment encontrés), celui-ci a été purifié et ensuite hydrolysé par un mélange de sulfatase et de glucuronidase. L'action de ces enzymes permet d'observer une augmentation du pic HPLC correspondant à la ZEA alors que le pic du produit diminue. Le produit de transformation de la ZEA est donc bien un conjugué glycosilé ou sulfaté.

II.1.2 Détermination de la structure chimique du produit

Pour déterminer la structure chimique détaillée du conjugué, celui-ci a été purifié puis sa masse exacte a été révélée par LC/MS/MS grâce un appareil permettant une détection de la masse très précise (ESI-LTQ-Orbitrap). Deux signaux majeurs ont été détectés à m/z 317,139 et m/z 397,096 qui correspondent respectivement à la ZEA et à son conjugué (cf Figure 64). La différence de masse obtenue entre la ZEA et son conjugué est de 79,957. C'est exactement la masse d'un groupement sulfate.

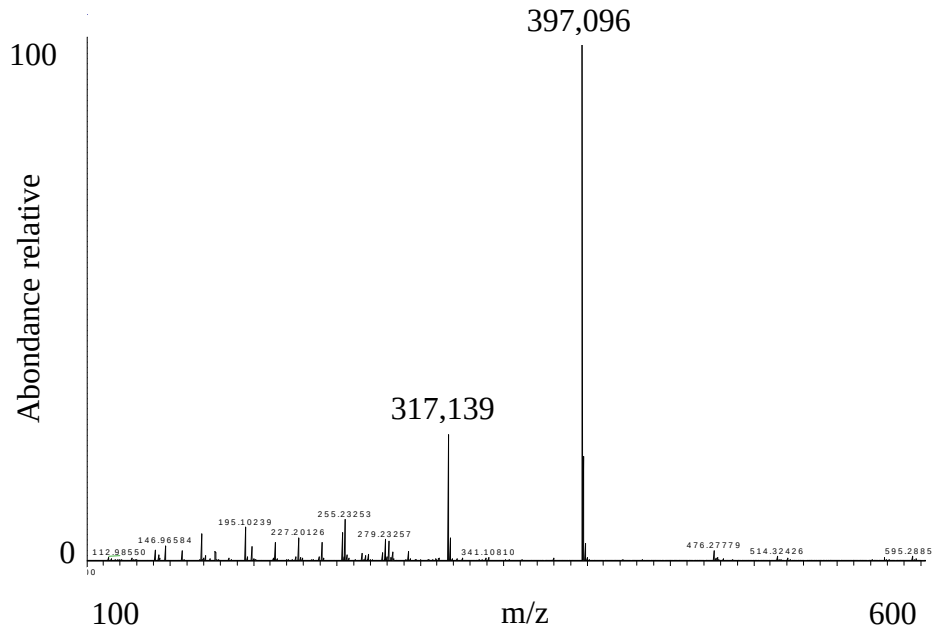
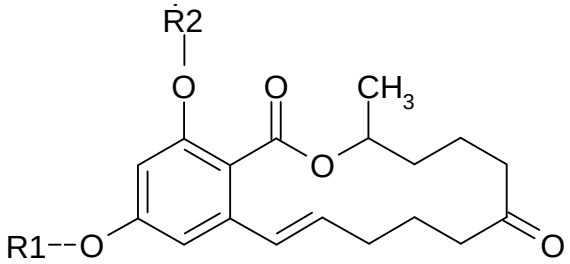


Figure 64 : Spectre de masse du conjugué de la ZEA

Une observation du massif isotopique du conjugué de la ZEA a permis de confimer la formule brute du composé : $C_{18}H_{21}O_8S$. Le conjugué produit par l'isolat d'*A. niger* CA936 est donc de la ZEA-sulfate (cf Figure 65). Deux possibilités existent pour le positionnement du groupement sulfate, et seule une analyse RMN nous permettra de déterminer la bonne structure.



R1 : SO_3^- et R2 : H ou R1 : H et R2 : SO_3^-

Figure 65 : Structure chimique de la ZEA-sulfate.

III Efficacité de la transformation

III.1 Transformation de la ZEA en ZEA-sulfate par A. niger CA936

Considérant la masse obtenue par analyse de masse exacte, soit 397,096, la concentration molaire de la ZEA-sulfate produite a été comparée à la concentration molaire de la ZEA (cf Figure 66). Cela a pu être effectué en émettant l'hypothèse que la ZEA-sulfate avait le même coefficient d'absorption en fluorimétrie que la ZEA. On observe que la ZEA est éliminée de façon concomitante à l'apparition de la ZEA-sulfate. A partir de 24h d'incubation, la concentration en ZEA commence à diminuer alors que la ZEA-sulfate commence à apparaître. Après 96h d'incubation, environ 100 µM de ZEA est éliminée alors que 51,5 µM de ZEA-sulfate est formée, soit 51,5% de transformation du substrat en ce produit.

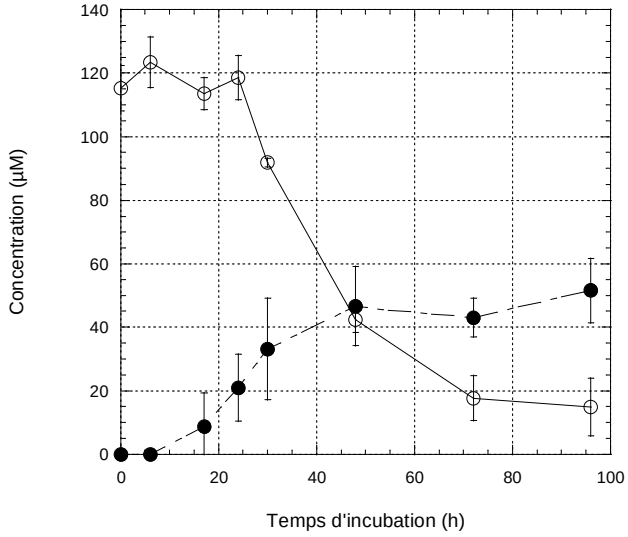


Figure 66 : Transformation de la ZEA (○) en ZEA-sulfate (●) par l'isolat *A. niger* CA936 en croissance sur du milieu contaminé par 50 µg/mL de ZEA (soit 150 µM).

III.2 Transformation de la ZEA en ZEA-sulfate par d'autres isolats

La production de ZEA-sulfate à partir de ZEA a été étudiée pour les différentes souches (*Streptomyces sp.* et *Aspergillus sp.*) utilisées pour le criblage (cf Chapitre 3). La présence de ZEA-sulfate a été déterminée par analyse HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique (Fluo) et le cas échéant confirmée par LC/MS. Aucune des espèces de *Streptomyces* n'est capable de transformer la ZEA en ZEA-sulfate. Par contre, parmi les *Aspergillus*, les isolats d'*A. niger* sont plus efficaces que les autres espèces pour effectuer cette transformation. L'isolat le plus efficace, *A. niger* GX312, est capable de produire en moyenne 15,6 µg/ mL de ZEA-sulfate après 7 jours d'incubation dans un milieu contaminé par 50 µg/mL de ZEA.

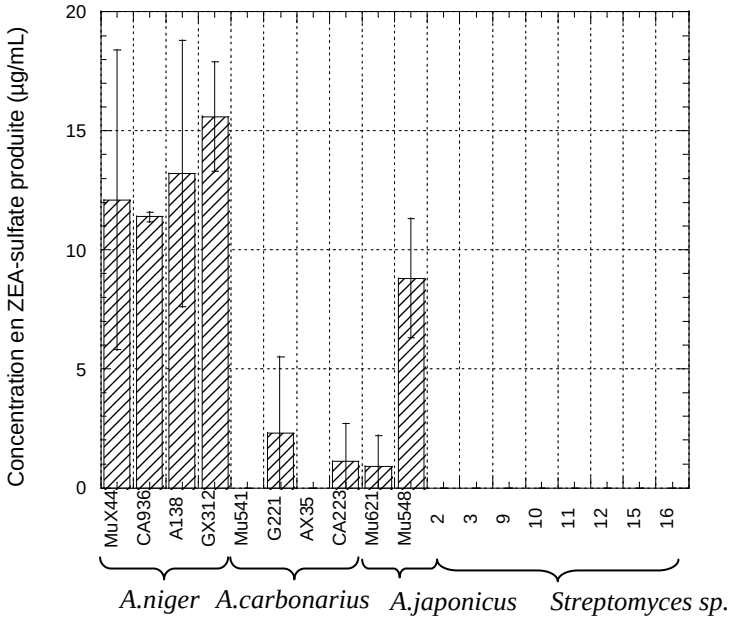


Figure 67 : Production de ZEA-sulfate à partir de ZEA (50 µg/mL) par différents isolats d'*Aspergillus* après croissance pendant 7 jours à 28°C sous agitation.

IV Détermination de la toxicité de la ZEA-sulfate

IV.1 Mise au point du test de prolifération

Un test de prolifération a été effectué sur les cellules cancéreuses MCF-7 (passage 156 et 157) sur plaque 96 puits. Les cellules ont été incubées à 37°C et en présence de 5% de CO_2 pendant 24h afin qu'elles s'attachent au support. Le milieu a été changé par du milieu contenant 5% de sérum de veau fétal traité au charbon pour qu'il ne contienne pas d'hormone oestrogénique. Nous avons ensuite ajouté les molécules oestrogéniques à tester (ZEA, β-estradiol) puis laissé incuber pendant 4, 5 et 6 jours. Différentes concentrations en composés ont été testées (cf Figure 68).

Les indices de prolifération ont été calculés. Ils représentent les ratios entre l'absorbance obtenue en présence du composé ajouté et l'absorbance du témoin négatif (cellules seules). Plus le composé est oestrogénique, plus l'indice de prolifération sera important. Un indice de prolifération égal à 1 représente une croissance normale des cellules. L'estradiol est ici le composé témoin pour la prolifération des cellules. Les indices de prolifération sont compris entre 1,3 et 2,1 pour la ZEA et entre 1,6 et 2,6 pour l'estradiol, selon le temps d'incubation et la concentration étudiée. Pour la suite des expérimentations, la durée d'incubation des cellules avec les composés à tester a été choisie de 5 jours (temps correspondant aux indices de prolifération maximum de l'estradiol).

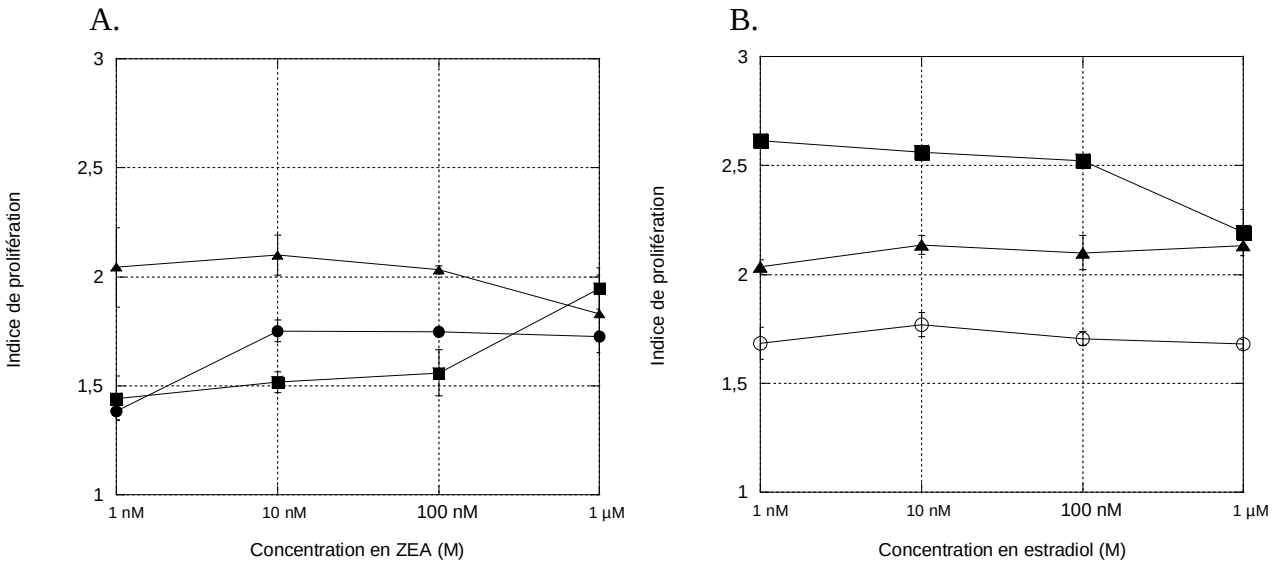


Figure 68 : Prolifération des cellules MCF-7 en présence de ZEA (A.) et d'estradiol (B.) à différentes concentrations (10^{-9}M à 10^{-6}M) pendant 4 (○), 5 (■) ou 6 jours (▲).

IV.2 Prolifération en présence de ZEA-sulfate

Les surnageants de culture d'*A. niger* CA936, cultivé en présence de 50 µg/mL de ZEA pendant 0 à 96h, ont ensuite été testés pour connaître leur capacité à faire proliférer les cellules MCF-7 (cf Figure 69). Des dilutions préalables ont été effectuées pour se retrouver dans la gamme de prolifération voulue.

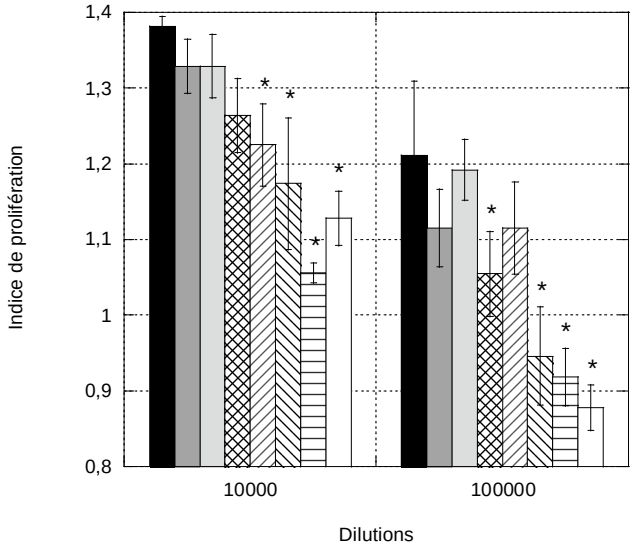


Figure 69 : Indices de prolifération des cellules MCF-7 en présence de surnageants de culture de l'isolat d'*A. niger* CA936 incubé avec 50 µg/mL de ZEA à différents temps d'incubation à savoir t_0 (■), 6h (▒), 17h (□), 24h (X), 30h (//), 48h (\\), 72h (=), 96h (□) aux dilutions 10 000 et 100 000.

Pour les 2 dilutions utilisées, plus le temps d'incubation augmente, plus les indices de prolifération diminuent, donc la culture d'*A. niger* CA936 en présence de ZEA permet de diminuer la toxicité globale du mélange, et il n'y a donc pas d'effet toxique synergique entre la ZEA et la ZEA-sulfate.

La toxicité de la ZEA-sulfate seule a ensuite été comparée à la toxicité de la ZEA (cf Figure 70).

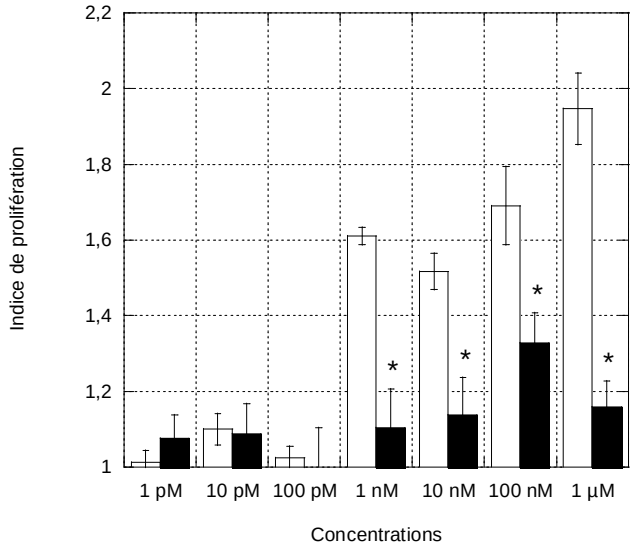


Figure 70 : Indices de prolifération des cellules MCF-7 en présence de ZEA (□) et de ZEA-sulfate (■) à différentes concentrations (de 1 pM à 1 µM).

A partir de concentrations en ZEA et ZEA-sulfate de 1 nM, une prolifération significative des cellules MCF-7 est observée. Celle-ci est toujours moindre dans le cas de la ZEA-sulfate par rapport à la ZEA. Le conjugué est donc moins toxique.

V Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que certains isolats d'*Aspergillus* de la section Nigri sont capables de transformer la ZEA en ZEA-sulfate. La détermination de la structure du conjugué s'est effectuée en plusieurs étapes. D'abord, la masse exacte du composé a été déterminée et il s'est avéré qu'elle était plus importante que celle de la ZEA (resp. 397,096 et 317,139). La transformation observée n'est donc pas une hydrolyse de la ZEA comme pour d'autres microorganismes (Takahashi-Ando *et al.*, 2002) mais bien une conjugaison.

Le mycelium de certaines de ces espèces testées est également capable de transformer l'OTA en OTα (Bejaoui *et al.*, 2005). Par exemple, la souche en croissance d'*A. niger* MuX44 peut éliminer 80% de l'OTA à 2 µg/mL.

Pour mieux caractériser la réaction de transformation impliquée, la concentration molaire de la ZEA éliminée a été comparée à la concentration molaire en ZEA-sulfate produite. Un peu moins de 50% de la quantité molaire n'est pas quantifiée. Pourtant, aucun autre produit connu tels que l'α et la β-zearalenol n'ont été observés. La quantification de la ZEA-sulfate a été effectuée en partant de l'hypothèse que la ZEA et la ZEA-sulfate ont le même coefficient d'absorption en fluorimétrie. Cependant, il est possible que dans les conditions de détection de la ZEA (λex =275 nm ; λem =450 nm), la quantité de ZEA-sulfate soit sous-estimée. En effet, nous avons estimé une réponse 1,7 fois moins importante de la ZEA-sulfate par rapport à la ZEA.

Seules 2 études précédentes ont mis en évidence d'autres microorganismes capables de transformer la ZEA en ZEA-sulfate. *R. arrhizus* transforme 26% de la ZEA initialement présente en ZEA-4-sulfate et 18% en α-zéaralénol (El Sharkawy *et al.*, 1991). Certaines espèces de *Fusarium* sont quant à elles des espèces productrices de ZEA et de ZEA-sulfate. Par exemple, à partir de riz comme substrat, *F. graminearum* produit 2400 nmol par g de riz de ZEA pour 570 nmol par g de riz de ZEA-sulfate (Plasencia et Mirocha, 1991). On ne peut donc pas parler de transformation de la ZEA mais de la production d'un nouveau métabolite par une souche toxinogène. Mirocha *et al.* (1981) ont eux montré la présence de ZEA-sulfate dans des urines de bovins. Les bovins semblent donc avoir la capacité de sulfoner la ZEA.

D'autres composés, essentiellement des composés phénoliques, peuvent être sulfonés par une variété d'organismes comme des moisissures, des actinomycètes, des rongeurs, des mammifères et des humains (Cerniglia *et al.*, 1982; Ibrahim et Abul-Hajj, 1989; Falany *et al.*, 1995; Rikke et Roy, 1996; Nagata et Yamazoe, 2000; Blanchard *et al.*, 2004). La sulfo-conjugaison chez les mammifères est connue pour être une voie classique de détoxication et d'excrétion de xénobiotiques et particulièrement de stéroïdes (Luu-The *et al.*, 1996). Cette transformation entraîne une augmentation de la polarité des molécules et permet une meilleure excrétion par les reins et la bile (Gamage *et al.*, 2006). Dans le métabolisme des xénobiotiques, 3 étapes sont nécessaires dans la sulfo-conjugaison (Falany *et al.*, 1997) et l'une d'entre elles correspond à l'activation du sulfate par l'ATP (Robbins et Lippman, 1956). Pourtant, aucune activité de sulfo-conjugaison n'a été détectée pour l'extrait brut dans un tampon d'extraction contenant de l'ATP et des ions sulfates. Il serait intéressant de tester l'activité de l'extrait brut de l'isolat *A. niger* CA936 en présence de PAPS (sulfate activé par l'ATP).

La ZEA et la 17-β-estradiol ont des conformations similaires et ces 2 molécules peuvent être sulfonées. L'estradiol sulfotransférase catalyse spécifiquement la sulfo-conjugaison de la 17-β-estradiol en position 3'-OH (Falany *et al.*, 1997). Les 2 études sur la ZEA-sulfate (El Sharkawy *et al.*, 1991 ; Plasencia et Mirocha, 1991) montrent que la sulfo-conjugaison de la ZEA s'effectue en position 4-OH du cycle phénol. Il est probable que le même type d'activité enzymatique est impliqué dans ces 2 transformations. Une analyse RMN de la ZEA-sulfate formée par la souche *A. niger* CA936 est la seule solution pour determiner la position du groupement sulfate sur la ZEA. Les aryl-sulfotransférases (EC 2.8.2.1), catalysant la réaction de transfert de sulfate activé par l'ATP sur un phénol, constituent un groupe d'enzymes très représentés chez de nombreux micro et macro-organismes. Nous avons comparé la séquence d'une aryl-sulfotransférase d'*A. niger* avec celles

d'autres organismes : Une grande homologie est retrouvée dans les séquences protéiques de nombreuses espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Pichia* et *Mycobacterium*. Celles-ci sont donc potentiellement capables de transformer également la ZEA en ZEA-sulfate.

L'oestrogénicité de la ZEA-sulfate a été évaluée par le test de proliferation de cellules MCF-7. Les valeurs de prolifération de la ZEA et de l'estradiol sont cohérentes avec des études de prolifération précédentes (Minervini *et al.*, 2005). L'incubation de la ZEA en présence de l'isolat *A. niger* CA936 permet de décroître la toxicité du milieu. Pas de synergie n'est donc observée par la présence de ZEA et de ZEA-sulfate simultanément. Ensuite, la toxicité de la ZEA-sulfate seule a été testée. Une diminution significative de la prolifération est observée, ce qui indique une baisse de la toxicité lorsque la ZEA est transformée en ZEA-sulfate. La ZEA est connue pour se fixer sur les récepteurs oestrogéniques grâce à sa conformation très proche de la β-estradiol (Gaumy *et al.*, 2001). L'addition de sulfate sur la ZEA change ses caractéristiques (conformation, polarité), et empêche sûrement ce conjugué de se fixer sur ces récepteurs, ce qui évite ainsi la prolifération des cellules MCF-7. Il aurait d'ailleurs été intéressant de prouver cela en dosant les oestrogènes produits par ces cellules. Nous aurions ainsi pu mettre en évidence que la ZEA-sulfate ne se fixe pas sur les récepteurs oestrogéniques des cellules MCF-7. De façon similaire, il a été montré que l'addition de sulfate sur la β-estradiol lui empêche de se fixer sur les récepteurs oestrogéniques (Falany *et al.*, 2002). Des études précédentes ont été menées *in vivo* pour évaluer la toxicité de la ZEA-sulfate. Pour se faire, des rates ont été nourries avec de la nourriture contaminée par de la ZEA et de la ZEA-sulfate et le poids de leur utérus par rapport à leur poids corporel a été mesuré (Plasencia et Mirocha, 1991). Le conjugué sulfaté entraîne un plus faible grossissement de l'utérus de rate que la ZEA mais conserve cependant une activité oestrogénique par rapport au témoin.

Le fait que les espèces de *Streptomyces* soient capables d'éliminer la ZEA sans produire de ZEA-sulfate montre l'existence d'autres métabolismes possibles chez ces espèces. C'est sûrement une voie à explorer également pour la suite de cette étude.

Ce travail peut mener à un moyen efficace de détoxication de la ZEA dans l'alimentation animale. Il serait important de déterminer les enzymes impliquées dans la sulfo-conjugaison de la ZEA et de les caractériser. La détermination de la stabilité de la ZEA-sulfate dans le système digestif sera une étape clé pour être sûr que la ZEA ne sera pas relarguée. En effet, il est nécessaire que la ZEA-sulfate résiste à une hydrolyse acide possible dans l'estomac et aux hydrolyses enzymatiques qui peuvent avoir lieu dans l'intestin pour ne pas être relarguée avant absorption par l'animal.

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale

Durant ce travail, nous avons mis en évidence, dans un premier temps, la capacité de spores d'*Aspergillus* de la section Nigri à adsorber les mycotoxines (OTA, ZEA, FB1). Cette caractéristique avait déjà été observée sur l'OTA par Bejaoui *et al.* (2006). Nous avons élargi le champ d'étude à plusieurs mycotoxines et essayer de comprendre les phénomènes impliqués. L'adsorption entre les spores et les mycotoxines semble être majoritairement du à des interactions hydrophobes. La comparaison entre l'efficacité d'adsorption de plusieurs mycotoxines, avec des propriétés physico-chimiques différentes, a permis d'élucider en partie ce phénomène. Les composés impliqués dans l'adsorption n'ont pas encore été identifiés mais une des hypothèses la plus probable est la présence d'hydrophobines à la surface des spores, composés responsables de l'adsorption des spores sur des surfaces (Dague *et al.*, 2008). L'adsorption par les spores est compétitive, dans certaines conditions, par rapport à d'autres types adsorbants commerciaux. Cependant, il semble délicat de proposer comme moyen universel de décontamination d'un aliment l'ajout de spores. Si des études technico-économiques poussées montrent un réel avantage de ce procédé par rapport à d'autres déjà existants, il faudra s'assurer de la non présence de composés toxiques à la surface des spores et de leur innocuité.

Dans un second temps, nous avons essayé de trouver des microorganismes capables de transformer la ZEA en composé non toxique. Pour ce faire, plusieurs souches d'*Aspergillus* de la section Nigri et de *Streptomyces* du laboratoire ont donc été testées. L'élimination de la ZEA d'un milieu contaminé a été observée pour différentes souches. La transformation de la ZEA par des souches d'*Aspergillus* de la section Nigri a été caractérisée comme étant une sulfo-conjugaison. Pour les souches de *Streptomyces*, aucun produit de transformation n'a encore été déterminé. La toxicité de la ZEA-sulfate a été ensuite évaluée au laboratoire par test de prolifération cellulaire de lignée cellulaire MCF-7. Nous avons donc montré que des isolats d'*A. niger*, espèce largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour sa grande variété d'activités métaboliques recherchées, sont capables de greffer sur la ZEA un groupement sulfate. Le changement de polarité et de conformation de la molécule induit sûrement une incapacité de celle-ci à se fixer sur des récepteurs oestrogéniques. La sulfo-conjugaison de la ZEA permet donc de réduire sa toxicité. Cette étude a permis de déterminer la présence d'une voie de détoxication de la ZEA chez *A. niger*. Elle permet également d'ouvrir une voie sur la possibilité d'utiliser des sulforansférases comme additif alimentaire pour détoxifier la ZEA.

Perspectives envisagées

Il serait intéressant, pour poursuivre la première partie de cette étude, d'aller plus loin dans la détermination de l'efficacité d'adsorption des spores en mimant de manière plus réelle un système digestif comme cela a été fait pour d'autres adsorbants (Avantaggiatto *et al.*, 2003) et en utilisant de la nourriture naturellement contaminée. Le taux d'absorption des mycotoxines avec et sans adsorbant pourra être déterminé. Nous pourrions également déterminer l'efficacité d'un mélange d'adsorbants (par exemple parois de levure et spores), peut-être plus efficace que l'ajout d'un seul type d'adsorbant. Des mycotoxines marquées pourraient également être ingérées dans ce type de modèle pour déterminer la stabilité du complexe spores/mycotoxines. Nous pourrions ainsi suivre le trajet des mycotoxines de l'absorption à l'excrétion avec ou sans adsorbant. Si dans ce type de modèle, l'adsorption semble stable, des études *in vivo* seront ensuite nécessaires pour valider le procédé proposé. La toxicité et l'efficacité des mycotoxines greffées sur les spores pourront ainsi être déterminées. Il faudra également s'assurer que l'adsorption est spécifique aux mycotoxines et que des nutriments essentiels au bon fonctionnement de l'animal ne soient pas piégés. Pour aller plus loin dans la compréhension et pour l'application, il serait également intéressant de déterminer les composés responsables de cette adsorption. Les différents composés de la surface des spores pourraient par exemple être extraits et leur efficacité d'adsorption testée. L'addition d'un composé purifié, extrait de paroi de spores, pourrait ainsi être utilisé comme adsorbant contre les mycotoxines. L'innocuité et l'efficacité des composés extraits pourraient alors être déterminées. Il serait alors peut être possible de synthétiser les composés responsables pour un coût moindre. Nous aurions ainsi utilisé les propriétés intéressantes des spores d'*Aspergillus* pour élaborer un adsorbant pur, plus facile à accepter pour une mise sur le marché. L'efficacité de l'adsorbant pur devra être prouvée et comparée aux autres produits disponibles sur le marché.

Concernant la deuxième partie de cette étude, beaucoup de barrières restent encore à franchir pour une application industrielle future. La non-toxicité de la ZEA-sulfate ayant été suggérée *in vitro*, il faudrait maintenant s'assurer de la stabilité de cette molécule *in vivo*. En effet, aucun relarguage de la ZEA ne doit être observé pendant un éventuel passage dans le système digestif comme cela a été observé pour le DON-glucoside (Berthiller *et al.*, 2009). Si la ZEA-sulfate est stable, il pourrait alors être envisagé de purifier les enzymes responsables de cette transformation. Celle-ci pourrait alors faire partie d'un cocktail enzymatique ingéré par l'animal pour l'aider à détoxifier la ZEA. Les souches étudiées ont également montrées leur capacité à transformer l'OTA en OTα. Il serait donc intéressant d'isoler ces deux activités enzymatiques pour une action double. Il semble difficilement envisageable d'utiliser une souche d'*A. niger* en tant que probiotique. En effet, *A. niger* est capable de produire de nombreux métabolites secondaires, qui pourraient poser problème chez l'animal. Une solution plus plausible serait d'inclure dans la ration alimentaire un cocktail enzymatique d'*A. niger*. Pour ce faire, il faudra extraire les enzymes d'intérêt, les purifier et les caractériser. C'est ce que nous avons essayé de faire mais aucune activité n'a été observée de manière significative après lyse des cellules.

Les deux méthodes d'élimination peuvent être également couplées. En effet, il est possible de transformer la ZEA en ZEA-sulfate puis de l'adsorber totalement grâce à son groupement sulfate ionisé.

Pour les deux méthodes d'élimination de la ZEA proposées ici, de nombreuses avancées ont été effectuées mais de nombreuses questions ont également été soulevées. Le passage de la phase laboratoire à la phase validation doit encore être étudié. Il faudra également déterminer l'intérêt d'un tel procédé par rapport à d'autres déjà présents sur le marché (parois de levure en particulier) afin d'en retirer un réel avantage concurrentiel.

Références

Références

1. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. 2009. Rapport final : Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.
2. Abbès, S., Ouanes, Z., Salah-Abbès, J.B., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., Bacha, H. 2007. Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone. *Mutat. Res.*, **631**, 85-92.
3. Abrunhosa, L., Serra, R., Venancio, A. 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7493-7496.
4. Abrunhosa, L., Santos, L., Venancio, A. 2006. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food biotechnol.*, **20**, 231-242.
5. Afifi, A.F., Foaad, M.A., Fawzi, E.M. 2003. Effect of gamma irradiation on elimination of aflatoxins produced by apple mycoflora in apple fruits. *Acta Microbiol. Pol.* **52**, 379-86.
6. Afolabi, C.G., Bandyopadhyay, R., Leslie, J.F., Ekpo, E.J. 2006. Effect of sorting on incidence and occurrence of fumonisins and *Fusarium verticillioides* on maize from Nigeria. *J. Food Prot.*, **69**, 2019-2023.
7. Alberts, J.F., Engelbrecht, Y., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H. et van Zyl, W.H. 2006. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 121-126.
8. Altalhi, A.D., El-Deeb, B. 2009. Localization of zearalenone detoxification gene(s) in pZEA-1 plasmid of *Pseudomonas putida* ZEA-1 and expressed in *Escherichia coli*. *J. Hazard Mater.*, **161**, 1166-1172.
9. Aly, S.E., Abdel-Galil, M.M., Abdel-Wahhab, M.A. 2004. Application of adsorbent agents technology in the removal of aflatoxin B(1) and fumonisin B(1) from malt extract. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 1825-1831.
10. Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., Cabras, P. 2007. *In vitro* interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2043-2048.
11. Aravind, K. L., Patil, V. S., Devegowda G., Umakantha B., Ganpule S. P. 2003. Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry science*, **82**, 571-576.
12. Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F., Magan, N., Lebrihi, A. 2007. Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes and wine. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 961-968.
13. Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. 2003. Assessing the zearelenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 1283-1290.
14. Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 817-824.
15. Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., Visconti, A. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, **22**, 379-88.

16. Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A. 2007. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an *in vitro* gastrointestinal model. *J. Agric. Food Chem*., **55**, 4810-4819.
17. Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseker, K., Rogers, H.S., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., Slutsker, L. 2005. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environ. Health Perspect.*, **113**, 1779-1783.
18. Barna-Vetro, I., Gyongyosi, A., Solti, L. 1994. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of *Fusarium* T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 729-731.
19. Barrier-Guillot, B., Pons, B., Delambre, L., Gouet, H. 2007. Effet des pratiques culturales sur le niveau de production de DON sur blé : synthèse de trois années d'enquêtes. Congrès Mycotoxines fusariennes des céréales – Arcachon - 11–13 septembre 2007.
20. Barron, D., Varin, L., Ibrahim, R. K, Harborne, J. B., Williams, C. A. 1988. Sulphated flavonoids-an update. *Phytochemistry*, **27**, 2375-2395.
21. Beardall, J.M., Miller, J.D. 1994. Diseases in humans with mycotoxins as possible causes. In: Miller JD, Trenholm HL, eds. Mycotoxins in Grain : Compounds other than Aflatoxin. St Paul (Minnesota): Eagan Press.
22. Beeton, S., Bull, A.T. 1989. Biotransformation and detoxification of T-2 toxin by soil and freshwater bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 190-197.
23. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces strains*. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1038-1044.
24. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. Lebrihi, A. 2005. Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8224-8229.
25. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. 2006. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section Nigri species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiol. Lett.*, **255,** 203-208.
26. Berthiller, F., Shuhmacher, R., Adam, G., Krska, R. 2009. Significance of masked *Fusarium* mycotoxins. ISM conference 2009, Tulln, 9-11 september.
27. Bennett, G.A., Anderson, R.A. Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products: a review. 1978. *J. Agric.Food Chem*., **26**, 1055-1060.
28. Bilgrami, K.S., Choudhary, A.K. 1998. Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.), Mycotoxins, Agriculture and Food Safty. Marcel dekkers Publishers, New York.
29. Binder, E.M., Binder J. 2004. Strain of *Eubacterium* that detoxyfies trichothecenes. International patent US 6794175, Erber Aktiengesellschaft.
30. Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds abd feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137**, 265-282.
31. Blackwell, B.A., Gilliam, J.T., Savard, M.E., David Miller, J., Duvick J.P. 1999. Oxidative deamination of hydrolyzed fumonisin B(1) (AP(1)) by cultures of *Exophiala spinifera*. *Nat. Toxins*, **7,** 31-38.
32. Blanchard, R. L., Freimuth, R. R., Buck, J.,Weinshilboum,R. M., Coughtrie, M. W. H. 2004. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics*, **14**, 199–211.

33. Bodie, E.A., Bower, B., Berka, R.M., Dunn-Coleman, N.S. 1994. Economically important organic acid and enzyme products, p. 561-602. *In* S.D. Martinelli, J.R. Kinghorn (ed), Aspergillus: 50 Years On., Elsevier, Amsterdam.
34. Böswald, C., Engelhardt, G., Vogel, H., Wallnöfer, P.R. 1995. Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. *Nat. Toxins*, **3**, 138-44.
35. Bouslimi, A., Bouaziz, C., Ayed-Boussema, I., Hassen, W., Bacha, H. 2008. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicol.* **251**, 1-7.
36. Bové, F.J. 1970. The story of ergot. Basel; New-York, Karger Verlag.
37. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
38. Bren, U., Guengerich, F.P., Mavri, J. 2007. Guanine alkylation by the potent carcinogen aflatoxin B1: quantum chemical calculations. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1134-1140.
39. Bueno, D.J., Casale, C.H., Pizzolitto, R.P., Salvano, M.A., Oliver, G. 2007. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* : a theoritical model. *J. Food Prot.*, **70**, 2148-2154.
40. Bullerman, L.B., Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.*, **119**, 140-146.
41. Burges, H.D., Burrell, N.D. 1964. Cooling of bulk grain in the British climate to control storage insects and to improve keeping quality. *J. Sci. Food. Agric.* **15**, 32-50.
42. Bursian, S.J., Aulerich, R.J., Cameron, J.K., Ames, N.K., Steficek, B.A. 1992. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate in reducing the toxicity of dietary zearalenone to mink. *J. Appl. Toxicol.* **12**, 85-90.
43. Bursian, S.J., Mitchell, R.R., Yamini, B., Fitzgerald, S.D., Murphy, P.A., Fernandez, G., Rottinghaus, G.E., Moran, L., Leefers, K., Choi, I. 2004. Efficacy of a commercial mycotoxin binder in alleviating effects of ochratoxin A, fumonisin B1, moniliformin and zearalenone in adult mink. *Vet. Hum. Toxicol.*, **46**, 122-129.
44. Canadas, D. 2006. Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition subchronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués ?. *Thèse doctorale de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.*
45. Carson, M.S., Smith, T.K. 1983. Role of bentonite in prevention of T-2 toxicosis in rats. *J. Anim. Sci.*, **57**, 1498-1506.
46. CAST Report. 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. In: J.L. Richard and Payne, G.A. (Eds.), Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report No. 139, Ames, Iowa, USA. ISBN 1-887383-22-0.
47. Cazzaniga, D., Basilico, J.C., Gonzalez, R.J., Torres, R.L., de Greef, D.M. 2001. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Lett. Appl. Microbiol.*, **33**, 144-147.
48. Cecchini, F., Morassut, M., Garcia Moruno, E., Di Stefano, R. 2007. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.*, **23**, 411-417.
49. Cerniglia, C.E., Freeman, J.P., Ronald, K.M. 1982. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1070-1075.

50. Champeil, A., Fourbet, J.F., Doré, T., Rossignol, L. 2004. Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Prot.*, **23**, 531-537.
51. Chen, F., Ma, Y., Xue, C., Ma, J., Xie, Q., Wang, G., Bi, Y., Cao, Y. 2008. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. *J. Vet. Sci.*, **9**, 39-44.
52. Cheng, Y.H., Weng, C.F, Chen, B.J., Chang, M.H. 2006. Toxicity of different *Fusarium* mycotoxins on growth performance, immune responses and efficacy of a mycotoxin degrading enzyme in pigs. *Anim. Res.*, **55**, 579-590.
53. Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E., Hall, H.H. 1966. Microbial Detoxification of Aflatoxin. *Appl. Microbiol.*, **14**, 934-939.
54. Claverie-Martin, F., Diaz-Torres, M.R. Geoghegan, M.J. 1986. Chemical composition and electron microscopy of the rodlet layer of Aspergillus nidulans conidiospores. *Curr. Microbiol.*, **14**, 221-225.
55. Clements, M.J., Maragos, C.M., Pataky, J.K., White, D.G. 2004. Sources of resistance to fumonisin accumulation in grain and fusarium ear and kernel rot of corn. *Phytopathology*, **94**, 251-260.
56. Côté, L.M., Nicoletti, J., Swanson, S.P., Buck, W.B. 1986. Production of deepoxydeoxynivalenol (DOM-l), a metabolite of deoxynivalenol, by *in Vitro* rumen incubation. *J. Agr. Food Chem.*, **34**, 458-460.
57. Dague, E., Alsteens, D., Latgé, J.P., Dufrêne, Y.F. 2008. High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophys. J.*, **94**, 656-660.
58. Daković, A., Tomasevic-Canovic, M., Dondur, V., Rottinghaus, G.E., Medakovic, V., Zaric, S. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **46**, 20-25.
59. Daković, A., Matijasević, S., Rottinghaus, G.E., Dondur, V., Pietrass, T., Clewett, C.F. 2007. Adsorption of zearalenone by organomodified natural zeolitic tuff. *J. Colloid Interface Sci.*, **311**, 8-13.
60. Daković, A., Matijasević, S., Rottinghaus, G.E., Ledoux, D.R., Butkeraitis, P., Sekulić, Z. 2008. Aflatoxin B(1) adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **66**, 20-25.
61. DS DS/EN 14352 Foodstuffs - Determination of fumonisin B1 and B2 in maize based foods - HPLC method with immunoaffinity column clean up.
62. Decker, W.J., Corby, D.G. 1980. Activated charcoal adsorbs aflatoxin B1. *Vet. Hum. Toxicol.*, **22**, 388-389.
63. De Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., Castoria, R. 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, **98**, 1261-1270.
64. Del Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A.V., Rivas, B.D.L., Garcia-Moruno, E., Munoz, R. 2007. *In vitro* removal of ochratoxine A by wine lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **70**, 2155-2160.
65. Döll, S., Dänicke, S., Valenta, H., Flachowsky, G. 2004. *In vitro* studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch. Anim. Nutr.*, **58**, 311-324.
66. Driehuis, F., Oude-Elferink, S.J. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quaterly*, **22**, 212-216.
67. Dragacci, S., Grosso, F., Frémy, J.-M. 2005. Analyse et détection des mycotoxines, Edition TI Sciences et Techniques, P 3330.

68. Dufrêne, Y., van der Wall, A., Norde, W., Rouxhet, P. 1997. X-ray photoelectron spectroscopy analysis of whole cells and isolated cell walls of gram-positive bacteria : comparison with biochemical analysis. *J. Bacteriol.*, **179**, 1023-1028.
69. Duvick, J., Rood, T., Maddox, J., Gilliam, J. 1997. Detoxification of mycotoxins *in planta* as a strategy for improving grain quality and disease resistance: identification of fumonisin-degrading microbes from maize. In: Molecular Genetics of Host Specific Toxins in Plant Diseases (Kohmoto K, Yoder OC, eds). Dordrecht/Boston: Kluwer Academic, 369–381.
70. Duvick, J., Rood, T.A. 2000. Zearalenone detoxification compositions and methods.
71. US patent 6074838, Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Des Moines, IA).
72. Duvick, J. 2001. Prospects for Reducing Fumonisin Contamination of Maize through Genetic Modification. *Environ. Health Perspect.*, **109**, 337-342.
73. Duvick, J., Bowen, B., Gilliam, J., Maddox, J., Rood, T., Wang, X. 2003. Fumonisin detoxification compositions and methods. US patent 6670189, Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Des Moines, IA).
74. Edrington, T.S., Sarr, A.B., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D. 1996. Hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS), acidic HSCAS, and activated charcoal reduce urinary excretion of aflatoxin M1 in turkey poults. Lack of effect by activated charcoal on aflatoxicosis. *Toxicol. Lett.*, **89**, 115-122.
75. Edrington, T.S., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Rottinghaus, G.E. 1997. Influence of superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poult. Sci.*, **76**, 1205-1211.
76. El-deeb, B.A. 2005. Isolation and characterization of soil bacteria able to degrade zearalenone. *J. Bot.*, **32**, 3–30.
77. El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.*, **61**, 466-468.
78. El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B, from the chicken duodenum. *J. Food Prot.*, **63**, 549-552.
79. El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S., Mykkanen, H. 2002. Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium. Food Addit. Contam.*, **19**, 680-686.
80. El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminem, S., Mykknen, H. 2004. Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *J. Agr. Food Chem.*, **52**, 4577-4581.
81. El Sharkawy, S.H., Abul-Hajj, Y. 1987a. Microbial transformation of zearalenone 1. Formation of zearalenone 4-b-glucoside. *J. Nat. Prod.*, **50**, 520-521.
82. El Sharkawy, S.H., Abul-Hajj, Y. 1987b. Microbial transformation of zearalenone 2. Reduction, hydroxylation, and methylation products. *J. Org. Chem.*, **53**, 515-519.
83. El Sharkawy, S.H., Abul-Hajj, Y. 1988. Microbial clivage of zearalenone. *Xenobiotica*, **18**, 365-371.
84. El Sharkawy, S.H., Mustafa, I.S., Mohamed, S.A., Halaweish, F.T. 1991. Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 449-552.
85. Engelhardt, G. 2002. Degradation of ochratoxin a and b by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Mycotox. Res.*, **18**, 37-43.

86. Falany, J.L., Krasnykh, V., Mikheeva, G., Falany C.N. 1995. Isolation and expression of an isoform of rat estrogen sulfotransferase. *J. Steroid. Biochem. Mol. Bio.*, **52**, 35-44.
87. Falany, C.N. 1997. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.*, **11**, 206-216.
88. Falany, J.L., Macrin, N. and Falany, C.N. 2002. Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by β-estradiol sulfatation. *Breast Cancer Res. and Treat.,* **74**, 167-176.
89. Fazeli, M.R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M.R., Vaghari, E., Pouragahi, S. 2009. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *J. Food Prot.*, **72**, 189-192.
90. Feofilova, E.P., Nemtsev, V., Tereshina, V.M., Memorskaya, A.S. 2006. Developmental change of the composition and content of the chitin-glucan complex in the fungus *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **42**, 545-549.
91. Finamore, A., Britti, M.S., Roselli, M., Bellovino, D., Gaetani, S., Mengheri, E. 2004. Novel approach for food safety evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7425-7431.
92. Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C., Buhr, M.M. 1989. Measurement of the relative affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, **94**, 691-694.
93. Freimund, S., Sauter, M., Rys, P. 2003. Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *J. Environ. Sci. Health B.* 38, 243-255.
94. Freundlich, H.M.F. 1906. U ¨ ber die Adsorption in Lo ¨ sungen. *Z. Phys.Chem.*, **57**, 385–470.
95. Fricke, R.F., Jorge, J. 1990. Assessment of efficacy of activated charcoal for treatment of acute T-2 toxin poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **28**, 421-31.
96. Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 9727-9732.
97. Fuchs, E., Binder, E.M., Heidler, D., Krska, R. 2002. Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Addit. Contam.*, **19**, 379-386.
98. Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., Knasmüller, S. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 1398-1407.
99. Galtier, P., Alvinerie, M. 1976. *In vitro* transformation of ochratoxin A by animal microbioal floras. *Ann. Rech. Vet.*, **7**, 91-98.
100. Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A., Chies, L., Galvano, M. 1998. Activated carbons: in vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot.*, **61**, 469-475.
101. Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., McManus, M.E. 2006. Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicol. Sci.*, **90**, 5-22.
102. Gaumy, J.L., Bailly, J.D., Burgat, V., Guerre, P. 2001. Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Revue Méd. Vét.*, **152**, 219-234.
103. Gromadzka, K., Chelkowski, J., Popiel, D., Kachlicki, P., Kostecki, M. and Glinski, P. 2009. Solid substrate bioassay to evaluate the effect of *Trichoderma* and *Clonostachys* on the production of zearalenone by *Fusarium* species. *World Mycotoxin Journal*, **2**, 45-52.

104. Guan, S., Ji, C., Zhou, T., Li, J., Ma, Q., Niu, T. 2008. Aflatoxin B(1) degradation by *Stenotrophomonas maltophilia* and other microbes selected using coumarin medium. *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 1489-1503.
105. Guan, S. Heb, J., Young, C., Zhub, H., Lib, X-Z, Jia, C, Zhou, T. 2009. Transformation of trichothecene mycotoxins by microorganisms from fish digesta. *Aquaculture*, **290**, 290-295.
106. Guerre, P. 2000. Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination des aliments du bétail par des mycotoxines. *Rev. Méd. Vét.*, **12**, 1095-1106.
107. Hao, D.Y.Y., Brackett, R.E. 1989. Growth and survival of *Flavobacterium Aurantiacum* in peanut Milk. *J. Food Prot.*, **52**, 165-168.
108. Haschek, W.M., Gumprecht, L.A., Smith, G., Tumbleson, M.E., Constable, P.D. 2001. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. *Environ. Health Perspect.*, **109** Suppl 2, 251-257.
109. Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem. Biol. Interact.*, **128**, 39-49.
110. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpä, P.E., Salminen, S., Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B(1) by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3086-3091.
111. He, P., Young, L.G. and Forsberg, C. 1992. Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3857-3863.
112. Hesseltine, C.W. 1976. Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds. In: Mycotoxins and other fungal related food problems. Rodricks, J.V. (Eds.). Advances in Chemistry Series NO 149, American Chemical Society, Washington DC, USA.
113. Hill, A.V. 1910. The possible effects of the aggregation of molecules of hemoglobin on its dissociation curve. *J. Physiol. (London)*, **40**, 4-7.
114. Horinouchi, S. 2007. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 283-299.
115. Hormisch, D., Brost, I., Kohring, G.W., Giffhorn, F., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Farber, P., Holzapfel, W.H. 2004. *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. *Syst. Appl. Microbiol.*, **27**, 653-660.
116. Huwig, A., Freimund, S., Käppeli, O., Dutler, H. 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Letters*, **122**, 179-188.
117. Hwang, C.-A., Draughon, F.A. 1994. Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus. J. Food Prot.*, **57**, 410-414.
118. International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993b. Toxins derived from *Fusarium sporotrichioides*: T-2 toxin. pp 467-488. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 56. IARC, Lyon, France.
119. Ibrahim, A., Abul-Hajj, Y. 1989. Aromatic hydroxylation and sulfonation of 5'-hydroxyflavene by *Streptomyces fulvissimu*. *Appl. Environ. Microbiol.,* **55**, 3140-3142.
120. Igawa, T., Takahashi-Ando, N., Ochiai, N., Ohsato, S., Shimizu, T., Kudo, T., Yamaguchi, I., Kimura, M. 2007. Reduced Contamination by the Fusarium Mycotoxin Zearalenone in Maize Kernels through Genetic Modification with a Detoxification Gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1622-1629.
121. Jackson, P.E., Groopman, J.D. 1999. Aflatoxin and liver cancer. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **13**, 545-55.

122. Jansen van Rensburg, C., Van Rensburg, C.E., Van Ryssen, J.B., Casey, N.H., Rottinghaus, G.E. 2006. *In vitro* and *in vivo* assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult Sci*., **85**, 1576-1583.
123. JECFA, 2000. Zearalenone. In: joint FAO/WHO Expert Comittee on Food Additives (Eds.), Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO/FAO Food Additives Series 44. IPCS-International Programme on Chemical Safety. WHO, Geneva.
124. Jesenska, Z., Sajbidorova, I. 1991. T-2 toxin degradation by micromycetes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **35**, 41-49.
125. Johnsen, H., Odden, E., Lie, O., Johnsen, B.A., Fonnum, F. 1986. Metabolism of T-2 toxin by rat liver carboxylesterase. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1469-1473.
126. Kabak, B., Dobson, A.D., Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **46**, 593-619.
127. Kadakal, C., Poyrazoglu, E. S., Artik, N., Nas, S. 2004. Effect of activated charcoal on water-soluble vitamin content of apple juice. *J. Food Qual.*, **27**, 171-180.
128. Kakeya, H., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Onose, R., Yamaguchi, I., Osada, H. 2002. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys sp. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2723-2726.
129. Kamimura, H. 1986. Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus sp.*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 515-519.
130. Karaman, M., Basmacioglu, H., Ortatatli, M., Oguz, H. 2005. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *Br. Poult. Sci.*, **46**, 394-400.
131. Karlovsky, P., Edmund III Crane, H., Gilliam, J. T., Maddox, J. R. 2003. Compositions and methods of zearalenone detoxification. US patent 20030073239, Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Des Moines, IA).
132. Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K., Olsen, M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1070-1073.
133. King, R.R., McQueen, R.E., Levesque, D. and Greenhalgh, R. 1984. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1181-1183.
134. Klarić, M.S., Rumora, L., Ljubanović, D., Pepeljnjak, S. 2008. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B(1), beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Arch. Toxicol.*, **82**, 247-255.
135. Kollarczik, B., Gareis, M., Hanelt M. 1994. *In vitro* transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Nat. Toxins*, **2**, 105-110.
136. Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E. 1990. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poult. Sci.*, **69**, 1078-1086.
137. Kubo, K. 1996. Animal feed containing *Bacillus subtilis* FERM BP-3418 that decomposes aflatoxin. US patent 5 549 890, AHC, Inc. (Maebashi, JP).
138. Kurtbay, H.M., Bekçi, Z., Merdivan, M., Yurdakoç, K. 2008. Reduction of ochratoxin a levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2541-2545.
139. Langmuir, I. 1916. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.*, **40**, 1361–1403.

140. Langseth, W., Rundberget, T. 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *J. Chromatogr. A*, **815**, 103-121.
141. Lee, L.S., Dunn, J.J., DeLucca, A.J., Ciegler, A. 1981. Role of lactone ring of aflatoxin B1 in toxicity and mutagenicity. *Experientia*, **37**, 16-17.
142. Lemke, S.L., Grant, P.G., Phillips, T.D. 1998. Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3789-3796.
143. Lemke, S.L., Mayura, K., Reeves, W.R., Wang, N., Fickey, C., Phillips, T.D. 2001a. Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *Toxicol. Environ. Health A.*, **62**, 243-258.
144. Lemke, S.L., Ottinger, S.E., Ake, C.L., Mayura, K., Phillips, T.D. 2001b. Deamination of fumonisin B(1) and biological assessment of reaction product toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 11-15.
145. Lewis, D.H. 1991. Fungi and sugars-a suite of interactions. *Mycol. Res.*, **95**, 897-904.
146. Lillehoj, E.B., Ciegler, A., Hall, H.H. 1967. Aflatoxin B1 Uptake by *Flavobacterium Aurantiacum* and Resulting Toxic Effects. *J. Bacteriology*, **93**, 464-471.
147. Liu, D.L., Yao, D.S., Liang, R., Ma, L., Cheng, W.Q., Gu L.Q. 1998. Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens. Food Chem. Toxicol.*, **36**, 563-574.
148. Liu, D.L., Yao, D.S., Liang, Y.Q., Zhou, T.H., Song, Y.P., Zhao L., Ma L. 2001. Production, purification, and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillariella tabescens* (E-20). *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 461-466.
149. Lovett, J., Thompson, R.G. Boutin, BK. 1975. Trimming as a means of removing patulin from fungus-rotted apples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 909-911.
150. Luongo, D., Severino, L., Bergamo, P., De Luna, R., Lucisano, A., Rossi, M. 2006. Interactive effects of fumonisin B1 and alpha-zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 1403-1410.
151. Luu-The, V., Bernier, F., Dufort, I. 1996. Steroid sulfotransferases. *J. Endocrinol.*, **150**, S87-97.
152. MacDonald, S.J., Anderson, S., Brereton, P., Wood, R., Damant, A. 2005. Determination of zearalenone in barley, maize and wheat flour, polenta, and maize-based baby food by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study. *J AOAC Int.*, **88**, 1733-1740.
153. Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Márquez-Márquez, R., Reyes, A. 2006. Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B(1) contaminated corn. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 2058-2063.
154. Mally, A., Hard, G.C., Dekant, W. 2007. Ochratoxin A as a potential etiologic factor in endemic nephropathy: lessons from toxicity studies in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **45**, 2254-2260.
155. Mayura, K., Abdel-Wahhab, M.A., McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Edwards, J.F., Naguib, K., Phillips, T.D. 1998. Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: potential for hidden risks. *Toxicol. Sci.*, **41**, 175-182.
156. McKean, C., Tang, L., Billam, M., Tang, M., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J.S. 2006. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. *J. Appl. Toxicol.*, **26**, 139-147.
157. McMullen, J.R. 1977. Microbiological reduction of zearalenone and related compounds. US patent 4,004,978, IMC Chemical Group, Inc. (Terre Haute, IN).

158. Megharaj, M., Garthwaite, I., Thiele, J. H. 1997. Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**, 329-333.
159. Miazzo, R., Rosa, C.A., De Queiroz Carvalho, E.C., Magnoli, C., Chiacchiera, S.M., Palacio, G., Saenz, M., Kikot, A., Basaldella, E., Dalcero, A. 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poult. Sci.*, **79**, 1-6.
160. Miazzo, R., Peralta, M.F., Magnoli, C., Salvano, M., Ferrero, S., Chiacchiera, S.M., Carvalho, E.C., Rosa, C.A., Dalcero, A. 2005. Efficacy of sodium bentonite as a detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin and fumonisin. *Poult. Sci.*, **84**, 1-8.
161. Minervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A., Visconti, A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol. Lett.*, **159**, 272-283.
162. Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Robison, T.S. 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet. Toxicol.*, **19**, 25-30.
163. Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 439-445.
164. Minnervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A. Visconti, A. 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicol. Lett.*, **159**, 272-283.
165. Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E., Prillinger, H. 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans sp. nov.*, a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Syst. Appl. Microbiol.*, **27**, 661-671.
166. Monbaliu, S., Van Poucke, C., Van Peteghem, C., Van Poucke, K., Heungens, K., De Saeger, S. 2009. Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 3-11.
167. Motomura, M., Toyomasu, T., Mizuno, K., Shinozawa, T. 2003. Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from *Pleurotus ostreatus. Microbiol. Res.*, **158**, 237-242.
168. Munkvold, G.P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **41**, 99-116.
169. Murphy, P.A., Rice, L.G., Ross, P.F. 1993. Fumonisins B1, B2, and B3 content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *J. Agr. Food Chem.*, **41**, 263-266.
170. Muri, S.D., van der Voet, H., Boon, P.E., van Klaveren, J.D., Brüschweiler, B.J. 2009. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food Chem. Toxicol.* (*in press*).
171. Nagata, K., and Yamazoe, Y. 2000. Pharmacogenetics of Sulfotransferase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 159–176.
172. Nakazato, M., Morozumi, S., Saito, K., Fujinuma, K., Nishima, T., Kasai, N. 1990. Interconversion of aflatoxin B1 and aflatoxicol by several fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1465-1470.
173. Niderkorn, V., Boudra, H., Morgavi, D .P. 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 849-856.
174. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of fumonisin B1 in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). 2001. National Toxicology Program. NIH Publication No. 01-3955. U.S. Departement of health and human services.
175. Osborne, B.G., Ibe, F., Brown, G.L., Petagine, F., Scudamore, K.A., Banks, J.N., Hetmanski, M.T., Leonard, C.T. 1996. The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **13**, 141-153.

176. Osweiler, G.D., Stahr, H.M., Beran, G.W. 1990. Relationship of mycotoxins to swine reproductive failure. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 73-75.
177. Parent-Massin, D. 2004. Haematotoxicity of trichothecenes. *Toxicol. Lett.*, **153**, 75-81.
178. Paris, S. Debeaupuis, J.P., Crameri, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M.C., Schmitt, C., Philippe, B., Latgé, J.P. 2003. Conidial Hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1581-1588.
179. Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., Pohland, A.E. 1988. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 685-703.
180. Paul, P.A., Lipps, P.E., Hershman, D.E., McMullen, M.P., Draper, M.A., Madden, L.V. 2008. Efficacy of Triazole-Based Fungicides for Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Control in Wheat: A Multivariate Meta-Analysis. *Phytopatholgy*, **98**, 999-1011.
181. Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., de Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Debets, A.J., Dekker, P., van Dijck, P.W., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S., de Groot, P.W., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J.P., van den Hondel, C.A., van der Heijden, R.T., van der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M.J., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N.N., Ram, A.F., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P.J., Wedler, H., Wösten, H.A., Zeng, A.P., van Ooyen, A.J., Visser, J., Stam, H. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 189-190.
182. Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S. 2001. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.*, **84**, 2152-2156.
183. Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., Lebrihi, A. 2008. Isolation of *Bacillus spp.* from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxin A detoxification. *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1495-1502.
184. Péteri, Z., Téren, J., Vagvölgyi, C., Varga, J. 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.*, **24**, 205-210.
185. Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R., Heidelbaugh, N.D. 1988. Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult Sci.*, **67,** 243-247.
186. Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S., Ahokas, J. 2000. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *J. Food Prot.*, **63**, 645-650.
187. Pihet, M., Vandeputte, P., Trouchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F, Boucharasse, J.P. 2009. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol.*, 9, 177.
188. Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. An update review. *Revue Méd. Vét.*, **149**, 479-492.
189. Phillips, T.D., Sarr, A.B., Grant, P.G. 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Nat. Toxins*, **3**, 204-213.
190. Plasencia, J., Mirocha, C.J. 1991. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 146-150.

191. Politis, I., Fegeros, K., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Kantas, D. 2005. Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to supress the effects of achratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *Brit. Poult. Sci.*, **46**, 58-65.
192. Prandini, A., Sigolo, S., Filippi, L., Battilani, P., Piva, G. 2009. Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat. *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 927-931.
193. Pussa, T. 2007. Principles of food toxicology. Ed. CRC Press Inc., Tartu, Estonia .
194. Raju, M.V., Devegowda, G. 2000. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Br. Poult. Sci.*, **41**, 640-650.
195. Raymond, S.L., Smith, T.K., Swamy, H.V. 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.*, **81**, 2123-2130.
196. Reboux, G. 2006. Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Rev. *Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, **46**, 208–212.
197. Richard, J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, **119**, 3-10.
198. Rikke, B. A., Roy, A. K. 1996. Structural relationships among members of the mammalian sulfotransferase gene family. *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**, 331–338.
199. Robbins, P.W., Lippman, F. 1956. Identification of enzymatically active sulfate as adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2652-2653.
200. Rosenberg, R.F. 1976. The cell wall. *In* J.E. Smith and D.R. Berry (ed.), The filamentous fungi, Vol.2 Biosynthesis and metabolism. Edward Arnold Publishers, Baltimore.
201. Rotter, R.G., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R. 1989. Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in Leghorn chicks. *Can. J. Vet. Res.*, **53**, 449-453.
202. Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health*, **48**, 1-34.
203. Ruhland, M., Engelhardt, G., Schafer, W., Wallnofer, P.R. 1996. Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. *Nat. Toxins*, **4**, 254-260.
204. Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food chem.*, **59**, 57-67.
205. Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H., Van der Doelen, M.A., Fink-Gremmels, J. 2007. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia*, **163**, 81-90.
206. Schaafsma, A.W., Hooker, D.C. 2007. Climatic models to predict occurrence of *Fusarium* toxins in wheat and maize. *Int. J. Food Microbiol.*, **119**, 116-25.
207. Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Loibner, A.P., Braun, R., Binder, E-M. 2002. Evidence of ochratoxin A-detoxification activity of rumen fluid, intestinal fluid and soil samples as well as isolation of relevant microorganisms from these environments. *Mycotox. Res.*, **18A**, 183-187.
208. Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Mohln, M., Taübel, M., Loibner, A-P., Braun, R., Binder, E-M. 2003. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxine A. *Mycotox. Res.*, **19**, 124-128.
209. Schatzmayr, G., Zehner, F., Taübel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A-P., Binder, E-M. 2006. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol. Nutr. Foor. Res.*, **50**, 543-551.

210. Schatzmayr, D. 2008. Mycofix®: the sophisticated concept in mycotoxin deactivation. The World Mycotoxin Forum, the fifth conference, Noordwijk, Netherlands.
211. Schisler, D.A., Khan, N.I., Boehm, M.J. 2002. Biological control of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **504**, 53-69.
212. Schneweis, I., Meyer, K., Engelhardt, G., Bauer, J.. 2002. Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1736-1738.
213. Schneweis, I., Meyer, K., Ritzmann, M., Hoffmann, P., Dempfle, L., Bauer, J. 2005. Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.*, **59**, 155-163.
214. Schoental, R. 1991. Mycotoxins, porphyrias and the decline of the Etruscans. *J. Appl. Toxicol.*,**11**, 453-454.
215. Schoental, R. 1994. Mycotoxins in food and the plague in Athens. *J. Nutr. Med.*, **4**, 83-84.
216. Schrödter, R. 2004. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. *Toxicol. Lett.*, **153**, 47-49.
217. Sehu, A., Ergün, L., Cakir, S., Ergün, E., Cantekin, Z., Sahin, T., Essiz, D., Sareyyüpoğlu, B., Gürel, Y., Yiğit, Y. 2007. Hydrated sodium calcium aluminosilicate for reduction of aflatoxin in quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, **114**, 252-259.
218. Shantha, T. 1999. Fungal degradation of aflatoxin B1. *Nat. Toxins*, **7**, 175-178.
219. Shetty, P., Jespersen L. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci. Technol.*, **17**, 48-55.
220. Shetty, P.H., Hald, B., Jespersen, L. 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **113**, 41-46.
221. Shima, J., Takase, S., Takahashi, Y., Iwai, Y., Fujimoto, H., Yamazaki, M., Ochi, K. 1997. Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3825-3830.
222. Shirling, E. B., Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 313-340.
223. Sinha, A.K., Sinha, K.K. 1990. Insect pests, *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in stored wheat: a survey at north Bihar (India). *J. Stored Prod. Res.*, **26**, 223-226.
224. Sişman, T. 2006. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against the adverse effects of aflatoxin B1 on *D. melanogaster*. *Toxicol. Industrial Health*, **22**, 173-179.
225. Skrinjar, M., Rasic, J.L., Stojicic, V. 1996. Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. *Folia Microbiol. (Praha)*, **41**, 26-28.
226. Smiley, R.D., Draughon, F.A. 2000. Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *J. Food Prot.*, **63**, 415-418.
227. Snijders, C.H.A. 2004. Resistance in wheat to Fusarium infection and trichothecene formation. *Toxicol. Lett.*, **153**, 37-46.
228. Solfrizzo, M., Carratu, M.R., Avantaggiato, G., Galvano, F., Pietri, A., Visconti, A. 2001a. Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 507-511.
229. Solfrizzo, M., Visconti, A., Avantaggiato, G., Torres, A., Chulze, S. 2001b. *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia*. **151**, 147-153.

230. Soriano, J.M., Gonzalez, L., Catala, A.I. 2005. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog. Lipid. Res.*, **44**, 345-356.
231. Spanjer, M.C., Rensen, P.M., Scholten, J.M. 2008. LC-MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. Food Addit. Contam. Part A, **25,** 472-489.
232. Spotti, M., Fracchiolla, M.L., Arioli, F., Caloni, F., Pompa, G. 2005. Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid. *Vet. Res. Commun.*, **29**, 507-515.
233. Stander, M.A., Bornscheuer, U.T., Henke, E., Steyn, P.S. 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5736-5739.
234. Stander, M.A., Steyn, P.S., van Der Westhuizen, F.H., Payne, B.E. 2001. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 302-304.
235. Sudakin, D.L. 2003. Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **41**, 195-204.
236. Surai, P., Dvoeska, J. 2003. Novel method for improving antioxydant status of animals consuming feeds contaminated with mycotoxins. US patent 2003/007982 A1.
237. Swamy, H.V., Smith, T.K., MacDonald, E.J., Boermans, H.J., Squires, E.J. 2002. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.*, **80**, 3257-3267.
238. Swanson, S.P., Helaszek, C., Buck, W.B., Rood, H.D., Haschek, W.M. 1988. The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 823-829.
239. Swanson, S.P., Nicoletti, J., Rood, H.D., Buck, W.B., Cote, L.M., Yoshizawa, T. 1987. Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J. Chromatogr.*, **414**, 335-342.
240. Tajima, O., Schoen, E.D., Feron, U.J., Groten, J.P. 2002. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 685-695.
241. Tammer, B., Lehmann, I., Nieber, K., Altenburger, R. 2007. Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. *Toxicol. Lett.*, **170**, 124-133.
242. Tanaka, T., Yoneda, A., Inoue, S., Sugiura, Y., Ueno, Y. 2000. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **882**, 23-28.
243. Tangni, E.K., Simonis, J., Larondelle, Y., De Meeûs, D'argenteuil, L. 2006. Biological method for detoxification of a liquid food medium. US patent 2006/0263410 A1, Clark & Brody, Washington.
244. Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada H., Yamaguchi, I. 2002. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. *Biochem. J.*, **365**, 1-6.
245. Takahashi-Ando, N., Tokai, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I. and Kimura, M. 2005. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 838-844.
246. Takino, M., Tanaka, T., Yamaguchi, K., Nakahara, T. 2004. Atmospheric pressure photo-ionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. *Food Addit. Contam.*, **21**, 76-84.

247. Ténier, C. 2007. Utilisation de microorganismes spécifiques pour la biotransformation et la détoxification des mycotoxines en nutrition animale. *Présentation de la formation du CIIA sur résidus de pesticides et mycotoxines dans l'alimentation,* CEMAGREF, Paris.
248. Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Farber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., van Zyl, W.H., Steyn, P.S., Holzapfel, W.H. 2005. Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans sp. nov.* DSM44556(T). *Int. J. Food Microbiol.*, **105**, 111-117.
249. Thieu, N.Q., Ogle, B., Pettersson, H. 2008. Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets. *Trop. Anim. Health Prod.*, **40**, 649-656.
250. Ueno, Y., Nakayama, K., Ishii, K., Tashiro, F., Minoda, Y., Omori, T., Komagata, K. 1983. Metabolism of T-2 toxin in *Curtobacterium sp.* strain 114-2. *Appl. Environ . Microbiol.*, **46**, 120-127.
251. Utermark, J. Karlovsky, P. 2007. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 637-642.
252. Van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., Jonker, M.A. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 147-157.
253. Varga, J., Rigo, K., Teren, J. 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus species. Int. J. Food Microbiol.*, **59**, 1-7.
254. Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J., Vagvolgyi, C. 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, **99**, 321-328.
255. Videmann, B., Mazallon, M., Tep, J., Lecoeur, S. 2008. Metabolism and transfer of the mycotoxin zearalenone in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 3279-3286.
256. Visconti, A., Haidukowski, E.M., Pascale, M., Silvestri, M. 2004. Reduction of deoxynivalenol during durum wheat processing and spaghetti cooking. *Toxicol. Lett.*, **153**, 181-189.
257. Völkl, A., Vogler, B., Schollenberger, M., Karlovsky, P. 2004. Microbial detoxification of mycotoxin deoxynivalenol. *J. Basic. Microbiol.*, **44**, 147-156.
258. Voss, K.A., Bullerman, L.B., Bianchini, A., Hanna, M.A., Ryu, D. 2008. Reduced toxicity of fumonisin B1 in corn grits by single-screw extrusion. *J. Food Prot.*, **71**, 2036-2041.
259. Wegst, W., Lingens, F. 1983. Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**, 341-344.
260. Wu, F., 2006. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Res.*, **15,** 277-289.
261. Wu, F., 2007. Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds In : Morgavi, D.P., Riley, R.T. (Eds.), *Fusarium* and their toxins: Mycology, occurrence, toxicity, control and economic impact. Animal Feed Sciences and Technology.
262. Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, B.W. 1996. Toxicity of Ochratoxin A, Its Opened Lactone Form and Several of Its Analogs: Structure-Activity Relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **137**, 182-192.
263. Yiannikouris, A., Jouany, J-P. 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Prod. Anim.*, **15**, 3-16.
264. Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C.G., François, J., Bertin, G., Jouany, J.P. 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces*

cerevisiae cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnol. Lett.*, **25,** 783-789.

265. Yiannikouris, A. 2004. Etude des mécanismes chimiques impliqués dans la complexation de mycotoxines par les composants de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Thèse doctorale de l'Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.*
266. Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C-G., Bertin, G., Jeminet, G., Jouany J-P. 2004a. Alkali extraction of β-D-gluvcans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J. Agr. Food Chem.*, **52**, 3666-3673.
267. Yoshizawa, T., Hiroaki, T., Ohi, T. 1983. Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agric. Biological Chem.*, **47**, 2133-2135.
268. Young, J.C., Zhou, T., Yu, H., Zhu, H., Gong, J. 2007. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food Chem. Toxicol.*, **45**, 136-143.
269. Zhou, S.M., Lai, E.P.C. 2004. N-phenylacrylamide functional polymer with high affinity for ochratoxin A. *React. Funct. Pol.*, **58**, 35-42.
270. Zhou, T., He, J., Gong, J. 2008. Microbial transformation of trichothecene mycotoxins. *World Mycotoxin Journal*, **1**, 23-30.
271. Zinedine, A., Gonzalez-Osnaya, L., Soriano, J.M., Molto, J.C., Idrissi, L., Manes, J. 2006. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *Int. J. Food Microbiol*., **114**, 25-29.
272. Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.*, **45**, 1-18.
273. Zomborszky-Kovács, M., Vetési, F., Horn, P., Repa, I., Kovács, F. 2002. Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B1 in pigs. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, **49**, 197-201.

Sites web :

1. EMAN: European Mycotoxin Awareness Network. Groupe pluridisciplinaire rassemblant 14 organisations du champ des mycotoxines, représentant les gouvernements, l'industrie et les instituts de recherche de 13 Etats européens (l'AFSSA en fait partie). www.mycotoxins.com
2. Sciences et techniques de l'ingénieur : www.techniques-ingenieur.fr

Réglements :

1. Réglement (CE) No 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant sur la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.
2. Recommandation 2006/576/CE de la commission du 17 août 2006 concernant la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à l'alimentation animale, *Journal officiel de l'Union européenne*, 23/08/2003.

Annexes

Tables des annexes

Annexe I: Publication n°1…….……II
Annexe II: Publication n°2 …….……..XIV
Annexe III : Table de détermination des éléments par analyse ESCA …….....XXVIII
Annexe IV : Principe détaillé de la mesure de potentiel zéta ……XXIX

Annexe I: Publication n°1

Research article
The original publication is available at World Mycotoxin Journal.

Adsorption of zearalenone by *Aspergillus japonicus* conidia: new trends for biological ZON decontamination in animal feed

G. Jard[1], T. Liboz[1], F. Mathieu[1], A. Guyonvarc'h[2] and A. Lebrihi[1]

[1]ENSAT/INPT, Université de Toulouse: 1, av. de l'Agrobiopôle BP32607, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, 31326, France; [2]EVIALIS: Talhouët, BP 234, Vannes Cedex, 56006, France; lebrihi@ensat.fr

ABSTRACT

Zearalenone (ZON) is an estrogenic mycotoxin produced by *Fusarium sp*. on a wide variety of grains. The presence of ZON impairs farm animal health (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). In this study, the ability to remove ZON by *Aspergilli* conidia was evaluated *in vitro*. This mycotoxin was successfully eliminated *in vitro* by living and heat-treated conidia just after conidial inoculation especially by *A. japonicus* Mu541 (IMI389204) conidia. Consequently, components involved in adsorption are not affected by heat-treatment. Influence of pH on ZON removal was also determined. Results have shown that ZON removal was of 53% at pH 2 while 2% removal was observed at pH 11. Then, the adsorption capacity was evaluated *in vitro* in porcine gastrointestinal tract conditions. We observed that a better adsorption was done in acidic stomach conditions. Finally, the phenomenon has been modeled using Hill's equation. This model fit well and confirmed a better adsorption at acidic pH. *Aspergilli* section Nigri conidia were able to adsorb instantaneously ZON especially in acidic conditions as in the stomach. The use of heat-treated conidia could be very interesting to decrease ZON amounts in animal feed. It has now to be assessed directly on naturally contaminated feed and on animals.

Keywords: zearalenone, adsorption, *Aspergillus*, mycotoxins

INTRODUCTION

Zearalenone (ZON) is a naturally occurring secondary metabolite of *Fusarium* species, mainly *graminearum*, *culmorum*, *equiseti* (Bottalico *et al.*, 1989). ZON affects many agricultural products, especially cereals, in all over the world. It causes harmful effects on human and animal health because of its highly toxic properties (estrogenic, teratogenic, genotoxic, immunotoxic) (Gaumy *et al.*, 2001). Due to its strong hyperestrogenic effects, ZON results in impaired fertility and stillbirths in female animals (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). Despite the use of recommended agricultural practices to avoid mold development and consequent mycotoxin production during crop growth, harvesting and storage, contamination of ZON still occurs. Recently, a survey was performed to determine the occurrence of mycotoxins from diverse commodities and geographical regions and it showed that, from all survey samples, more than 30% were positive for ZON contamination (ZON more than 32 µg/kg) (Binder *et al.*, 2007). To limit the amount of ZON in animal feed, a maximal level between 0.1 mg/kg and 3 mg/kg according to feed origin (corn or others cereals) and target animals has been set by the European commission in 2006 (n° 2006/584/EC legislation n° 234).

Physical, chemical and biological methods were used to reduce the mycotoxin content of contaminated raw materials (Kabak *et al.*, 2006), but few of these methods have practical applications. An interesting strategy is to trap the mycotoxin with binding agents to decrease its bioavailability. These adsorbents can reduce the detrimental effect of mycotoxins by decreasing their access to the target organs. Organic adsorbents such as mineral clays, bentonites or aluminosilicates (Döll *et al.*, 2004; Sabater-Vilar *et al.*, 2007) as well as biologic adsorbents such as yeast cell wall components especially β-D-glucans (Yiannikouris *et al.*, 2004) or lactic acid bacteria (Niderkorn *et al.*, 2006; Shetty and Jespersen, 2006) have successfully shown their capacity to bind ZON. Some commercial products have been developed to contain combination of both yeast cell wall extract and mineral clay. This mixture is incorporated directly into pelleted feeds or fed directly to animals (Howes and Newman, 1999). Diversification of decontamination processes could permit the use of different strategies for optimal mycotoxin removal efficiency. That is why it is important to enrich available processes for efficient mycotoxin decontamination.

The purpose of this work was to assess *in vitro* the efficiency of ZON removal from laboratory medium by *Aspergillus japonicus* conidia. To better understand the removal mechanism between conidia and ZON, modeling adsorption curves were elaborated according to Hill's model. Finally, efficiency of this process was assessed in simplified gastrointestinal conditions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Zearalenone (ZON) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All components of Czapeck Yeast extract Agar (CYA) medium were purchased from Fischer Scientific Bioblock (Illkirch, France), except yeast extract which is from BD Difco (Le-Pont-de-Claix, France). The phosphate-citrate buffer was prepared with Na_2HPO_4 from Fischer Scientific Bioblock (Illkirch, France) and citric acid from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The borate buffer was prepared with BO_3H_3 from ADL & Prochilab (Lormont, France). Grade HPLC solvents (methanol, acetonitrile) were purchased from Fischer Scientific Bioblock (Illkirch, France).

Strains

In this study, five *Aspergillus* section Nigri strains, isolated from French grapes (Bejaoui *et al.*, 2006), were used. These were 3 *A. japonicus* (AX35, IMI389197; CA223, IMI389207; Mu541, IMI389204) and 2 *A. niger* (GX312, IMI388567; MuX44, IMI388565). Codes used for strains were determined thanks to grape varieties on which strains were isolated (Syrah: A; Carignan: CA; Muscat: Mu; Grenache: G), bunches number (from 1 to 10 or X) and isolate number. Isolates were deposited in the collection of the CABI Biosciences Bakeham Lane, Egham referenced with IMI accession number.

Preparation of conidia suspensions

Living conidia of *Aspergillus* section Nigri isolates were obtained from mycelium growth on CYA medium, at 25°C after 10 days of incubation time. Conidia were suspended in distilled water and conidial concentrations were evaluated by counting in a Thoma hematocymeter. Heat-treated conidia were obtained by autoclaving conidia suspended in distilled water for 20 minutes at 120°C.

Adsorption study

The screening of *Aspergillus* section Nigri isolates toward ZON removal capacity was conducted in 1.5 mL Eppendorf tube containing 500 µl of 0.05 mol/l phosphate-citrate buffer (pH 6) and artificially contaminated with ZON at 1 µg/ml. Each medium was inoculated by conidial suspensions to give a final concentration of 10^7 conidia/ml. Conidia were removed by filtration through 0.45 µm PVDF filter (Analypore), immediately following inoculation and after 60 minutes of contact under agitation (240 rpm) at room temperature.

Effect of conidial concentration and medium pH on the adsorption efficiency

For the following experiments, *A. japonicus* Mu541 (IMI389204) strain was chosen.
The effect of conidial concentration was determined using 1.5 mL Eppendorf tubes containing each 500 µl of 0.05 mol/l phosphate-citrate buffer (pH 6) and contaminated with ZON at 1 µg/ml. Tubes were inoculated by different *A. japonicus* Mu541 conidial suspension (heat-treated or living) to give final concentrations of 10^6, 10^7, 10^8, 2×10^8 conidia/ml. Conidia were then removed by filtration immediately after inoculation.
The effect of pH on ZON removal was conducted with 10^7 heat-treated Mu541 conidia/ml in 1.5 mL Eppendorf tubes containing 500 µl of 0.05 mol/l phosphate-citrate buffer at pH 2; 2.5; 3; 4; 5; 6; 7; 8 or in 1.5 mL Eppendorf tubes containing borate buffer 0.05 mol/l at pH 9; 10; 11. All tubes were contaminated with ZON at 1 µg/ml. Conidia were removed by filtration immediately after inoculation.

In vitro gastrointestinal adsorption assay

In vitro adsorption efficiency in porcine gastrointestinal tract conditions at 37°C was performed according to the method of Döll *et al.* (2004). Briefly, 1.5 mL Eppendorf tubes containing 500 µl of 0.05 mol/l phosphate-citrate buffer at pH 5 and contaminated with ZON at 1 µg/ml, were inoculated by heat-treated Mu541 conidial suspension to give final concentration of 10^8 conidia/ml. After 2 hours of incubation at 37°C, pH was adjusted to 3 by adding 6 mol/l of HCl and the tubes were incubated for an extra 2 hours at 37°C. After the incubation period, which simulated the conditions in the stomach, the pH was adjusted to 6 by adding 5 mol/l of NaOH. Tubes were incubated again for

2 hours at 37°C and the pH was then adjusted to 7. The last step was incubation for 2 hours at 37°C. Last two steps simulated the conditions in the small intestine. At each step, one tube was taken and conidia were removed by filtration.

Calculation of affinity constants from Hill's model

ZON concentration effect on its removal was determined in 1.5 mL Eppendorf tubes containing 0.05 mol/l of phosphate-citrate buffer (pH 6) and contaminated with ZON at different concentrations: 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 and 12 µg/ml. Inoculated heat-treated conidial were adjusted to a final concentration of 10^7 conidia/ml. Conidia were removed by filtration immediately after inoculation. The amount of bound mycotoxin was plotted as a function of the amount of added mycotoxin accorded to the Hill's equation (Hill, 1910). The amount of bound toxin was calculated by subtracting the amount of free toxin found in the experimental tubes from the amount found in control tubes with no adsorbent. DataFit 7.1 software (Oakdale Engineering; Oakdale, Pennsylvania, USA) was used to plot the experimental data, to set up the regression curve (curve fitting) and to calculate the statistical data in the binding capacity tests. Hill's model with *n* sites was used to characterize the adsorption of ZON at pH 2.5 and pH 6 (Table 1).

Table 1. Hill's theoretical model with *n* sites accounting for biological interactions.

Hill's model with *n* sites[a]	$T_{bound} = \frac{T_{bound}^{\max}(T_{initial})^n}{KD + (T_{initial})^n}$; $K_d = \sqrt[n]{KD}$; $A = \frac{T_{bound}^{\max}}{2K_d}$

[a] Biological parameters: the association constant per site (Kd), the maximal amount of toxin bound ($T_{bound}^{\max}$), the saturation point (Ksat), the number of fixation site (*n*), and the affinity rate (A).

Biological parameters such as the association constant per site (K_d), the maximal amount of toxin bound ($T_{bound}^{\max}$), the saturation point (K_{sat}), the number of fixation site (n) and the affinity rate (A) were computed (Fig. 1).

Detection and quantification of ZON

To solubilize ZON before analyses, 0.6 ml of grade HPLC methanol was systematically added to 0.4 ml of each sample remaining after filtration. ZON was then quantified using reverse-phase high performance liquid chromatography (ICS; Lapeyrouse Fossat, France). Detection was performed by a Merck Hitachi fluorescence Lachrom L-7485 detector (λex: 275 nm; λem: 450 nm). The analytical column used was a 120*30 mm Protonsil 3 µm C18-H column (Bischoff chromatography) fitted with a guard column of 10*4 mm (ICS). The mobile phase was acetonitrile: ultrapure water (70: 30) at a flow rate of 0.5 ml/min. 20 µl of the sample was injected by an automatically injector (ICS). The column temperature was kept at 25° C. ZON was identified and quantified depending on a standard curve. The detection limit was 0.01 µg/ml.

ZON removal was calculated by comparison to a negative control (medium contaminated with 1 µg/ml of ZON without conidia), according to this following equation:

$$\%_{removal} = 100 \times (1 - \frac{ZON_{peak \cdot area}}{ZON_{peak \cdot area \cdot in \cdot control}}).$$

Statistical analysis

All analyses were done in triplicate to calculate means and standard deviations. Means were compared using ANOVA test in Kaleidagraph 4.0 system (Synergy Software; Reading, Pennsylvania, USA). The significance threshold was set at $p<0.05$.

RESULTS

Screening of conidia from different strains to adsorb ZON and influence of incubation time on ZON removal

Results have shown that conidia from all isolates tested have the capacity to remove ZON from phosphate-citrate buffer (Fig. 2). Indeed, from 29% to 60% of ZON were eliminated depending on the isolate and incubation time. As soon as conidia were added to the medium, ZON removal was occurred. Longer incubation time seemed to have no major effect on ZON removal. For that, all adsorption experiments conducted in this study were performed just after contact. Among *Aspergilli* tested, *A. japonicus* Mu541 was shown to be the most efficient instantaneous ZON removal (43% of ZON removal). This strain was chosen for further experiments.

Influence of A. japonicus Mu541 conidial state and conidial concentration on ZON removal

For both living and heat-treated conidia, the higher concentration of conidia introduced in the medium is the greater ZON removal. Thus, at a concentration of 10^6 living conidia/ml, ZON adsorption was 29 % and to be 80% at a concentration of 2×10^8 living conidia/ml ($p<0.05$) (Fig. 3). ZON removal could be improved by increasing the quantity of conidia in aqueous buffer. ZON elimination percentages were similar with both living and heat-treated conidia (Fig. 3). For example, at 10^7 conidia/ml, ZON removal was 43% using living conidia and 42% using heat-treated conidia.

Influence of pH on ZON removal and in vitro gastrointestinal tract test

In the buffer medium, 53% of ZON was removed at pH 2 while 2% of ZON was removed at pH 11 (Fig. 4). Adsorption between ZON and conidia of Mu541 strain was more efficient at acidic pH ($p<0.05$). Further experiments were performed to evaluate the adsorption efficiency *in vitro* in porcine gastrointestinal tract conditions (Fig. 5). Stomach phase (i.e. pH 5 for 2 hours and pH 3 for 2 hours) showed better adsorption than intestine phase (i.e. pH 6 for 2 hours and pH 7 for 2 hours). Thus, 62% of ZON removal was obtained after stomach phase compared to 29% of ZON removal after intestine phase. It confirmed a better adsorption at acidic pH ($p<0.05$). Equilibrium between ZON adsorbed and free ZON appeared at each pH conditions.

Determination of adsorption parameters obtained by plotting according to Hill's model

Hill's model gives comprehensive information to explain the biological, physical and chemical analysis of the adsorption process (Yiannikouris *et al.*, 2003). As shown in Table 2, the regression coefficients R^2 between model and obtained results, for both pH, had values nearby 1, showing the reliability of the Hill's model. Adsorption parameters (Table 2) calculated according to the definitions given above (Table 1) showed differences between pH 2.5 and pH 6.

Table 2. Adsorption parameters calculated with the Hill's model equation for adsorption between ZON and Mu541 heat-treated conidia at pH 2.5 and pH 6[a].

Adsorption parameters[b]	pH 2.5	pH 6
n	1.6 ± 0.5	2.8 ± 0.4
T_{bound}^{max} (µg/ml)	3.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3
K_d (µg/ml)	7.2	4.8
K_{sat} (µg/ml)	9	6.5
A (%)	22.1	15.4
R^2	0.97	0.99

[a] Each adsorption test on ZON was done with 10^7 heat-treated Mu541 conidia/ml.

[b] Biological parameters: the association constant per site (Kd), the maximal amount of toxin bound (T_{bound}^{max}), the saturation point (Ksat), the number of fixation site (n), and the affinity rate (A).

Adsorption constants T_{bound}^{max}, which represents the maximal amount of potential adsorbed ZON on conidia, and *A*, which represents affinity between ZON and conidia, were higher at pH 2.5 than at pH 6 showing a better adsorption capacity at pH 2.5. The curves showing the amount of bound toxin in relation to the amount of ZON added were a sigmoid shape represented by *n* parameter. *n* value is higher than 1 which shows a cooperativity phenomenon between the toxin and the binder. First molecules of ZON adsorption on conidia increase the affinity of others molecules of ZON to conidia. Even if affinity rate is higher at pH 2.5 than at pH 6, value of *n* at pH 2.5 (n=1.6 ± 0.5) is less than at pH 6 (n=2.8 ± 0.4). Also, cooperativity phenomenon is more pronounced at pH 6 than at pH 2.5.

DISCUSSION

Removal of ZON by *A. japonicus* conidia could be a viable biological method, alternative to physical and chemical methods available for decontamination of raw materials, sometimes containing around 1 mg/kg of ZON. Our study has shown that 43 % of ZON could be removed instantaneously from contaminated buffer at an initial concentration of 1 µg/ml by adding 10^7 heat-treated conidia/ml. This removal was due to an adsorption phenomenon since ZON adsorbed could be recovered after methanol extraction.

Adsorption phenomenon by addition of *Aspergillus* section Nigri conidia was already observed (Bejaoui *et al.*, 2005) concerning removal of another mycotoxin, ochratoxin A (OTA). Authors observed that 30% of 2 µg/ml of OTA in natural grape juice could be removed instantaneously by living and heat-treated conidia from *Aspergillus* section Nigri at a concentration of 10^7 conidia/ml. Values of ZON and OTA removal by *A. japonicus* conidia were very similar in these two studies. Interestingly, OTA and ZON have similar chemical characteristics such as hydrophobicity and polarity. So, same interactions may be involved for both mycotoxins. ZON could also be adsorbed by yeast cell walls (Yiannikouris *et al.*, 2004) and by fermentative bacteria like lactic and propionic acid bacteria (Niderkorn *et al.*, 2006).

Heat-treated conidia could remove ZON as efficiently as living conidia. This phenomenon was also observed by Bejaoui *et al.* (2005) for *Aspergilli* conidia binding on OTA. Additional experiments (data not shown) were performed on *A. japonicus* Mu541 conidia treated by heat at different time (from 5 min to 90 min) and temperature (from 120°C to 140°C) showing that increasing time and

temperature permit to increase ZON removal. A partial destruction of conidia could relax the structure and could lead to a better accessibility of ZON to its fixation sites.

Influence of pH has been tested to give us clues to better understand the adsorption phenomenon between ZON and conidia. Acidic conditions permitted a better adsorption than both neutral and alkaline conditions. Electrostatic interactions seemed to be involved in the adsorption of ZON on *Aspergilli* conidia. However, ZON adsorption by fermentative bacteria seems not to be influenced by pH values (Niderkorn *et al.*, 2006). Nevertheless, the authors did not test alkaline pH.

Experiments performed in gastrointestinal conditions showed an adsorption of ZON during the stomach phase (acidic pH) more important than during intestine phase (neutral pH). Indeed, 62% of ZON was removed during stomach phase compared to 29% during intestine phase. However, ZON adsorbed at acidic pH could be desorbed at more alkaline pH. Further studies must be performed *in vivo* to really know if the complex ZON conidia will resist the variations of pH encountered through the passage in a real porcine digestive tube.

Hill's model of binding phenomenon permitted to show that adsorption is more efficient at pH 2.5 than at pH 6. It could be explained by a better spatial accessibility or by more favorable electrostatic interactions between ZON and fixation sites at pH 2.5 than at pH 6. Structure of components involved in the adsorption phenomenon could be more flexible and so could let ZON access to their fixation sites at acidic pH. Hill's model also underlined a cooperative phenomenon for both pH 2.5 and pH 6 (n>1). In our study, we observed that adsorption at pH 6 showed a greater cooperativity than adsorption at pH 2.5 ($n_{\text{pH 2.5}} < n_{\text{pH 6}}$). At neutral pH, structures of adsorption components may not permit ZON to access easily to its fixation site but the first bound molecules of ZON may facilitate the adsorption of other molecules of ZON by opening the structure.

Composition of *A. japonicus* Mu541 conidia walls may play an important role in the adsorption phenomenon. Components involved in adsorption of ZON on yeast cell walls were identified to be β-glucans (Yiannikouris *et al.*, 2004). Feofilova *et al.* (2006) showed that cell walls of *A. niger* are composed of two covalently linked carbohydrates: chitin and β-glucan. This complex is formed by 55% of chitin and 45% of glucan in mature spore of *A. niger*. So, phenomenon observed in our study for *A. niger* and potentially for *A. japonicus* could also be a binding of ZON to β-glucans. Heat-treated conidia are as efficient as living conidia to remove ZON which is very interesting for an animal feed detoxification application. Indeed, heat-treated conidia do not pose quality or security problems. Moreover, *A. japonicus* species are not OTA producer fungi. Thus no risk of OTA in heat-treated conidia could appear. So, it could be used as a safe decontamination process for practical applications. Our study clearly underscored the capacity of *A. japonicus* conidia to adsorb instantaneously ZON especially in acidic conditions as in the stomach. So, these heat-inactivated compounds could be a promising adsorbent to limit the bioavailability of mycotoxins. Further studies must be performed to determine the toxicity of ZON adsorbed and the stability of ZON-conidia complex.

Döll *et al.* (2005) have tested some commercial products on their capacity to adsorb ZON and for example, authors observed similar ZON removal with Mycosorb®extra (Alltech, Bad Segeberg, Germany). Conidia could remove ZON as efficiently as commercially used product which is very promising for our potential decontamination process. Further studies could be performed to investigate this adsorption phenomenon for other mycotoxins (OTA for example) and in case of multi-contaminated feed. *In vivo* experiments are also necessary to develop this application. Improvement of conidial binding of ZON could be performed with a better understanding of this

adsorption phenomenon but results already obtained are encouraging for the adaptation of this process to industrial conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors especially thank “Evialis” for supplying the project.

REFERENCES

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2005. Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53:8224-8229.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2006. Black *Aspergilli* and ochratoxin A in French vineyards. International Journal of Food Microbiology 111:S46-S52.

Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J. and Richard, J., 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology 137:265-282.

Bottalico, A., Logrieco, A. and Visconti, A., 1989. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. Mycopathologia 107:85-92.

Döll, S., Dänicke, S., Valenta, H. and Flachowsky, G., 2004. *In vitro* studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. Archives of Animal Nutrition 58:311-324.

Feofilova, E.P., Nemtsev, D.V., Tereshina, V.M. and Memorskaya, A.S., 2006. Developmental change of the composition and content of the chitin-glucan complex in the fungus *Aspergillus niger*. Applied Biochemistry and Microbioiogy 42:545-549.

Fink-Gremmels, J. and Malekinejad, H., 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. Animal Feed Science and Technology 137: 326-341.

Gaumy, J-L., Bailly, J.D., Burgat, V. and Guerre, P., 2001. Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. Revue médicale Vétérinaire 152:219-234.

Hill, A.V., 1910. The possible effects of the aggregation of molecules of hemoglobin on its dissociation curve. Journal of Physiology (London) 40 :4-7.

Howes, A.D. and Newman, K.E., October 1999. Compositions for removal of mycotoxins from feed. Canadian patent n° 2,328,966.

Kabak, B., Dobson, A.D. and Var, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46:593-619.

Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D.P., 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. Journal of Applied Microbiology 101:849-856.

Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., Van des Doelen, M.A.M. and Fink-Gremmels, J., 2007. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. Mycopathologia 163:81-90.

Shetty, P. and Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. Trends in Food Sciences and Technology 17:48-55.

Yiannikouris, A., Poughon, L., Cameleyre, X., Dussap, C-G., François, J., Bertin, G. and Jouany, J-P., 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins : application to zearalenone. Biotechnological Letters 25:783-789.

Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and Jouany, J-P., 2004. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Journal of Food Protection 67:1195-1200.

FIGURE

Figure 1. Curve of adsorption of a mycotoxin to an adsorbent according to Hill's model. K_d: association constant per site, T_{bound}^{max} : maximal amount of toxin bound, K_{sat}: saturation point, n: number of fixation site, A: affinity rate.

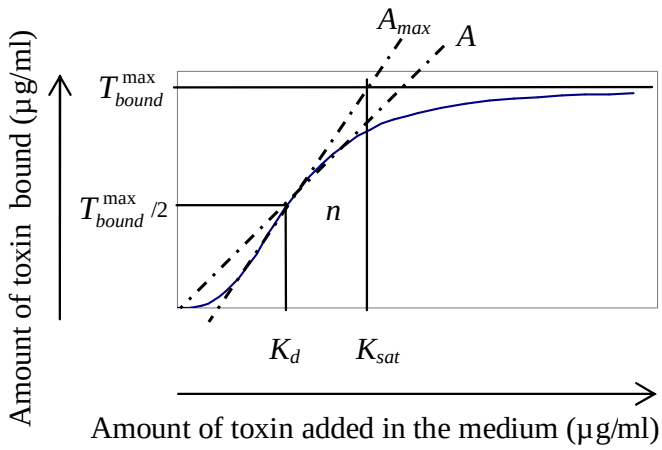


Figure 2. ZON removal by five *Aspergillus* section Nigri (3 *A.japonicus* : AX35 □, CA223 ▒, Mu541 ▓ and 2 *A. niger*: GX312 ■, MuX44 ▥) living conidia just after contact and after 60 minutes of incubation at a concentration of 10^7 conidia/ml in phosphate-citrate buffer (0.05 mol/l; pH 6), contaminated with ZON at 1 µg/ml. The ZON removal was calculated by comparing the ZON amount in sample to the ZON amount in control.

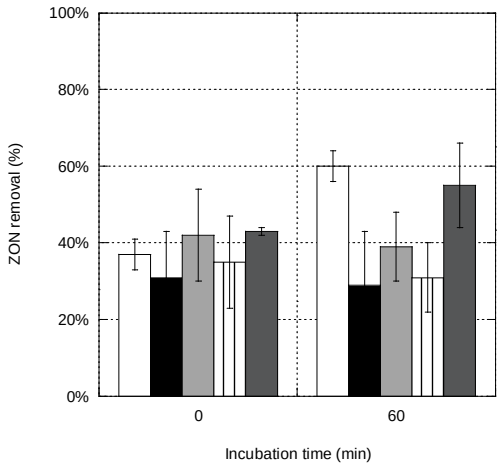


Figure 3. ZON removal immediately after contact by living (☐) and heat-treated (▨) conidia of *A. japonicus* Mu541 at different final concentrations of conidia (10^6; 10^7; 10^8; 2×10^8 conidia/ml) in phosphate-citrate buffer (0.05 mol/l; pH 6) contaminated with ZON at 1 µg/ml.

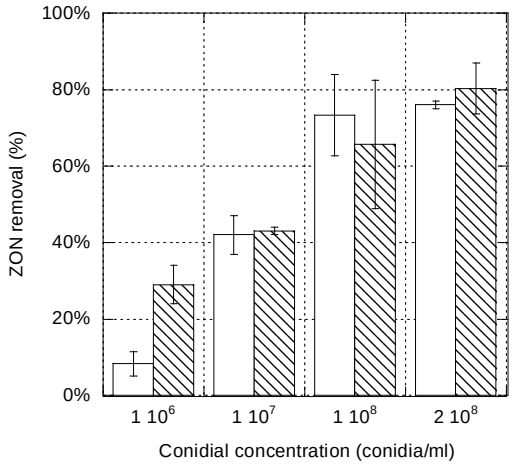


Figure 4. ZON removal by heat-treated conidia of *A. japonicus* Mu541 at a final conidial concentration of 10^7 conidia/ml in 0.05 mol/l phosphate-citrate buffer (pH 2; 2.5; 3; 4; 5; 6; 7; 8) or in 0.05 mol/l borate buffer (pH 9; 10; 11) contaminated with ZON at 1 µg/ml.

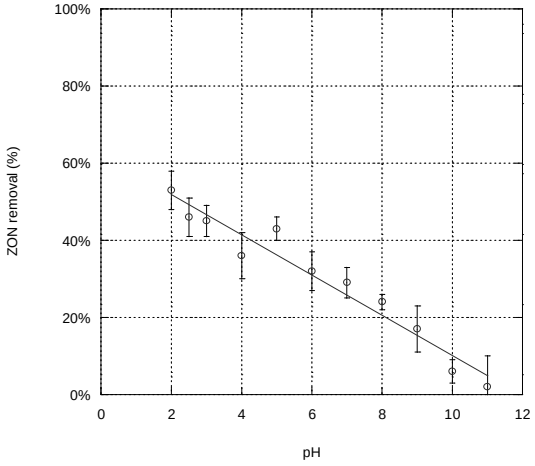
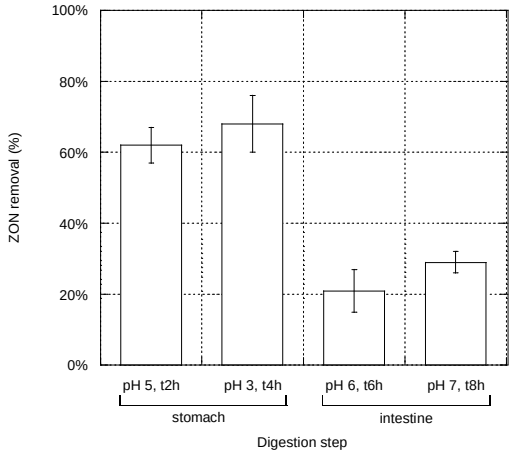


Figure 5. ZON removal in simulating porcine gastrointestinal tract conditions by heat-treated conidia of *A. japonicus* Mu541 at a conidial concentration of 10^8 conidia/ml in 0.05 mol/l phosphate-citrate buffer contaminated with ZON at 1 µg/ml.



Annexe II: Publication n°2

Research article

The original publication was accepted at World Mycotoxin Journal.

Transformation of Zearalenone to a Zearalenone Sulfate by *Aspergillus sp.*

G. Jard[1], T. Liboz[1], F. Mathieu[1], A. Guyonvarc'h[2], F. André[3], M. Delaforge[3] and A. Lebrihi[1]*
[1] Université de Toulouse, INP/ENSAT, LGC: 1, av. de l'Agrobiopôle BP32607, Auzeville-Tolosane, Castanet-Tolosan, 31326, France; [2]EVIALIS: Talhouët, BP 234, Vannes Cedex, 56006, France; [3]Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Gif-sur-Yvette, 91191, France;

ABSTRACT

The primary goal of this research was to assess the biotransformation of zearalenone (ZEA), an estrogenic mycotoxin, into ZEA-sulfate by some *Aspergillus* section Nigri isolates. *A. niger* isolates were shown to be able to convert ZEA after 72h of incubation at different ZEA concentration (5 to 150 µg/ml). The product formula corresponding to ZEA-sulfate was determined thanks to accurate mass measurement. This conjugate was shown to be less estrogenic than ZEA thanks to MCF-7 proliferation assay. This study demonstrated that *A. niger* have the ability to transform ZEA over a broad range of ZEA concentration (5 to 150 µg/ml) and that sulfonation could lead to a less toxic compound. These results are significant as little is known about the fate that fungi and especially *A. niger* are able to detoxify ZEA by sulfonation. This study could lead to a way of detoxification of natural mycotoxin contaminated feeds.

Keywords: Mycotoxins, Sulfo-conjugate, MCF-7 cell proliferation, Estrogenicity.

INTRODUCTION

Zearalenone (ZEA) is a naturally occurring secondary metabolite produced by several *Fusarium* species, including *graminearum, culmorum, equiseti* (Bottalico *et al.*, 1989). ZEA affects many agricultural products, especially cereals, all over the world and belongs to the five mycotoxins of toxicological and economical importance (CAST, 2003). ZEA causes harmful effects on human and animal health because of its highly estrogenic properties (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007). ZEA is able to bind with estrogenic receptors, resulting in severe effects on the reproductive system (Plasencia et Mirocha, 1991). Minervini *et al.* (2005) reported that ZEA is a strong estrogenic compound, using proliferation of breast cancer cell MCF-7 assay.

Detoxification strategies for contaminated foods and feeds to reduce or eliminate the toxic effect of ZEA by physical, chemical and biological methods (Kabak *et al.*, 2006) are crucial to improve food safety. Few of these methods have practical applications. An interesting strategy is to use microorganisms to transform mycotoxins into non-toxic products. A variety of microorganisms including bacteria, yeasts and fungi were found to be able to transform ZEA. Some fungi and actinomycetes like *Rhizopus sp.*, *Thamnidium sp.*, *Mucor sp.*, *Streptomyces sp.* are able to transform ZEA to a non-estrogenic substance, ZEA-4-O-glucoside (El-Sharkawy and Abul-Hajj, 1987a; Kamimura, 1986) or to hydroxylation or methylation products (El-Sharkawy and Abul-Hajj; 1987b). A variety of microorganisms like *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhodoturula sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.* were found to be able reduce ZEA to α-zearalenol and β-zearalenol (McMullen, 1977). This transformation could be regarded as an intoxification pathway since these derivatives have a great estrogenic activity (Minervini *et al.*, 2005). α-zearalenol could bind to estrogen receptors 10-20 times stronger than ZEA (Fitzpatrick *et al.*, 1989). Some *Rhyzopus sp.* and *Fusarium sp.* could convert ZEA into ZEA-sulfate (El Sharkawy *et al.*, 1991; Plasencia and Mirocha, 1991). A loss of toxicity was observed using rat uterus enlargement bioassay. Another fungus, *Clonostachys rosea* was showed to be able to remove ZEA (El-Sharkawy and Abul-Hajj, 1988). This preliminary study was emphasized by Takahashi-Ando *et al.* (2002) who identified and characterized a lactonohydrolase gene in this fungus which coded for an enzyme converting ZEA into a hydrolyzed and decarboxylated less estrogenic compound. Further studies on this lactonohydrolase were performed to reach different goals. First, Takahashi-Ando *et al.* (2005) succeed to express the synthetic lactonohydrolase gene in a heterologous system. Then, it was observed by Utermark and Karlovsky (2007) that the presence of this ZEA lactonohydrolase in *Clonostachys rosea* permitted its growth on a ZEA contaminated medium, a toxic medium for other fungi. Finally, Gromadzka *et al.* (2009) shown that this fungus could not only be used to decontaminate cereals but also as a biocontrol agent. Another applied study was performed by Molnar *et al.* (2004) who described a yeast strain, *Trichosporon mycotoxinivorans*, able to degrade ZEA to a non-toxic metabolite. This strain is used in a commercial product claimed to enzymatically detoxify ZEA, the feed additive Mycofix®plus (Biomin GmbH, Herzogenburg, Austria).

This paper describes the isolation and identification of a ZEA sulfate conjugate formed by some species of Nigri *Aspergillus*. The non estrogenic toxicity of this ZEA-sulfate was determined by Michigan Cancer Fondation-7 (MCF-7) cell culture.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and media

Zearalenone (ZEA), 17-β-estradiol (E_2) and charcoal stripped foetal bovine serum (CS-FBS) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All components of Czapeck Yeast extract Broth (CYB) and ISP_2 medium and grade HPLC solvents (methanol, acetonitrile) were purchased from Fischer Scientific Bioblock (Illkirch, France). Phenol red free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Phosphate buffered saline (PBS), trypsin- ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) solution, L-glutamine (GLU), penicillin, streptomycin antibiotic solution (AA), insulin and foetal bovine serum (FBS) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). CellTiter96®Aqueous (MTS) was purchased from Promega (Charbonnières les bains, France).

Microorganisms

Section Nigri *Aspergillus* isolates used in this study were isolated from French grapes (Bejaoui *et al.*, 2006). Codes used for isolates were determined thanks to grape varieties on which isolates were isolated (Syrah: A; Carignan: CA; Muscat: Mu; Grenache: G), bunches numbered (from 1 to 10 or X) and isolate number. *Aspergillus* section Nigri isolates were deposited in the collection of the "Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain", Belgium referenced with MUCL accession numbers. *Streptomyces sp.* were isolated from Saharan soil. These strains could not be deposited because of other confidential use. Most experiments were performed on *A. niger* isolate CA936. *Aspergilli* cultures were maintained on Czapeck Yeast extract Agar (CYA) and *Streptomyces* culture on International *Streptomyces* Project 2 (ISP_2) medium (Shirling and Gottlieb, 1966).

Conversion of ZEA by growing cells

Screening of *Aspergillus sp.* (respectively *Streptomyces sp.*) was performed in 1 ml of CYB medium (resp. ISP_2) contaminated by 50 µg/ml (resp. 10 µg/ml) of ZEA which was inoculated by 10^6 conidia/ml. The determination of ZEA concentration influence was performed in similar conditions with CYB medium contaminated by 5, 10, 50, 100 and 150 µg/ml of ZEA and innoculated by *A. niger* CA936 isolate, arbitrarily chosen. After incubation at 28°C for seven days for screening and only maximal time of 96h for influence concentration determination, in agitation, the medium was extracted by 1.5 ml of methanol. Mycelium and culture medium were separated by centrifuge (5,000g, 15 min). Supernatant was recovered to quantify ZEA by HPLC. Percentages of ZEA removal were calculated thanks to ZEA concentration in samples compared to ZEA concentration in negative control (without fungal or bacterial isolate). The ZEA disappearance and the apparition of ZEA-sulfate were assessed by liquid chromatography (LC) associated with fluorescence and mass spectrometry (MS) detection.

Detection and quantification of ZEA and its conjugate

ZEA and its conversion products were analysed using reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) thanks to analysis method adapted from Llorens *et al.* (2002) (ICS; Lapeyrouse Fossat, France). Detection was performed by a Thermo Separation Products FL3000 detector (excitation wave length λex: 275 nm; emission wave length λem: 450 nm). The analytical column used was a 120*5 mm Protonsil 5 µm C18-SH column fitted with a guard column of 10*4 mm (ICS). The initial mobile phase was methanol: ultrapure water (30:70) to reach methanol: ultrapure water (90:10) in 35 minutes. The flow rate is 0.8 ml/min. 60 µl of the sample were injected by an automatic injector (ICS). The column temperature was kept at 30°C. ZEA and its conjugate were identified by HPLC thanks to their retention time (respectively 29 min and 11 min) and ultraviolet (UV) spectra. ZEA was quantified using a ZEA standard curve. Molar absorption coefficient of ZEA-sulfate was considered to be similar to the ZEA one and so quantification of ZEA-sulfate was performed in the same manner. The detection limit was 0.01 µg/ml.
Confirmation of ZEA and ZEA-sulfate presence was performed using HPLC coupled with mass spectroscopy. The HPLC unit was performed using a 150 × 2 mm Kromasil 5 µm C18 column (Interchim, France) and the UV signal was recorded before injection into the mass spectrophotometer through an electrospray ion source (ESI) source (330°C, probe voltage 4500 V, gas pressure set at 40 psi and dry gas flow rate set at 9 l/min) operating in negative mode with focus potential set at 3.50 kV and an acquisition dwell time of 100 ms. The mobile phase 0.2 ml/min was composed of 10 mM ammonium acetate in water/acetonitrile (90/10 v/v) as solvent A and water/acetonitrile (10/90 v/v) as solvent B. The elution profile started with 10% of solvent B for 2 min, followed by a linear gradient of up to 80% solvent B within 22 min. After an isocratic period of 2 min, the system returned to initial conditions within 2 min. Samples were maintained at 4°C until analysis. A volume of 20 µl was injected into the chromatographic system. MS and MS^2 signal optimisations were made using ZEA. Data acquisition and processing were performed using Bruker Software.
ZEA-sulfate hydrolysis was made by incubation of a Sepak purified fraction dried under vacuum in the presence of 250 International Unit (IU) sulfatase Helix Pomatia and 5250 IU glucuronidase for 17h at 37°C in a 0.1 M acetate buffer at pH 5.2.

Determination of chemical structure of ZEA-sulfate

Supernatants of CA936 growing cells culture initially contaminated by 50 µg/ml of ZEA were evaporated and re-suspended in 10% acetonitrile. Separation of ZEA-sulfate from ZEA was achieved with a C_{18} column Sepak (Waters, Guyancourt, France). After equilibration of the column, the purified conjugate was first eluted with 50:50 of acetonitrile/water and ZEA was then eluted with 100% of acetonitrile.
Accurate mass of the purified conjugate was performed (mass errors under 5 ppm) by a LTQ-Orbitrap analyzer (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), fitted with a heated electrospray ion source (ESI) at a resolution of 30,000. The ESI-MS experiments were performed in negative ion detection mode.
Culture of MCF-7 cells and cell proliferation assay

Breast cancer cell lines MCF-7 (American Type Culture Collection HTB-22) were maintained in DMEM supplemented with GLU (1%), AA (1%), 10% of FBS and 0.1% insulin in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C. Cells were passaged at 80% confluence by trypsination (0.25% of trypsin-EDTA). Cells were used from the 152nd to the 162nd passage. MCF-7 cells were sown in 96 multiwell plates at 5,000 cells per well in 90 µl of DMEM 1% GLU, 1% AA, 5% FBS. The cells were allowed to attach for 24h and the medium was changed to the same medium with 5% of CS-FBS instead of

5% FBS in order to prevent influence on cell proliferation of hormones naturally present in non-treated FBS. The toxicity of supernatants of growing *A. niger* CA936 incubated with initial ZEA of 50 µg/ml at different incubation time from initial time to 96h was tested. Samples were diluted at 10,000 and 100,000 fold (i.e. ZEA concentration at initial time of 16 nM and 1.6 nM). The ZEA and E standards and purified ZEA-sulfate concentrations ranged from 1pM to 1 nM. Then, E, ZEA, purified ZEA-sulfate and culture supernatants at different concentrations, dissolved in the same culture medium were added to wells in quadruple. A negative control (cells only without tested compound) was included on each plate. After 5 days of incubation, cell proliferation was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfonyl)-2H- tetrazolium (MTS) test (CellTiter96®Aqueous, Promega). 20 µl of reagent were added to each well and absorbance was measured at 490 nm in a plate reader. The proliferation index was the ratio of the mean of the optical density value obtained with the tested product on that of negative control. If the tested compound had no estrogenic properties, MCF-7 cells would grow in the same manner as negative control and the proliferation index would be equal to 1. Values of proliferation indexes would increase with the estrogenic toxicity of the tested compound. The maximal ratio obtained among proliferation indexes for different concentrations is the proliferative effect (PE).

Statistical analysis

All analyses were done in triplicate or quadruplicate to calculate averages and standard deviations. Averages were compared using ANOVA test in Kaleidagraph 4.0 system (Synergy Software). The significance threshold was set at $p<0.05$.

RESULTS

Screening of microorganisms for ZEA biotransformation

10 isolates of *Aspergillus* section Nigri and eight isolates of *Streptomyces sp.* were tested on their ability to respectively remove 50 µg/ml and 10 µg/ml of ZEA (Table 1). Depending on *A. niger* isolates, ZEA removal was between, on average, 72% and 94% of initial ZEA. The two *A. carbonarius* isolates tested were able to remove, on average, 47% and 70% of initial ZEA. *A. japonicus* isolates were not able to remove ZEA as efficiently as other *Aspergillus* section Nigri isolates. The more efficient *A. japonicus* strain could only remove about 35% of initial ZEA. Among the eight *Streptomyces* isolates, five had the capacity to remove ZEA on average between 92% and 96%. Only three *Streptomyces* isolates did not remove ZEA or weakly (less than 22%). There was no formation of a fluorescent metabolite upon incubation of ZEA with *Streptomyces* isolates.

Table 1. ZEA removal and ZEA-sulfate production (µg/ml) of different isolates of *Aspergillus* section Nigri and *Streptomyces sp.*

Isolates	MUCL accession numbers	Species	ZEA removal (%)[a]	ZEA-sulfate production (µg/ml)[a,b]
MuX44		*A.niger*	72% ± 13%	12.1 ± 6.3
CA936		*A.niger*	83% ± 4%	11.4 ± 0.2
A138		*A.niger*	88% ± 7%	13.2 ± 5.6
GX312		*A.niger*	94% ± 1%	15.6 ± 2.3
Mu541		*A.japonicus*	21% ± 14%	ND
G221		*A.japonicus*	26% ± 16%	2.3 ± 3.2
AX35		*A.japonicus*	25% ± 13%	ND
CA223		*A.japonicus*	34% ± 4%	1.1 ± 1.6
Mu621		*A.carbonarius*	47% ± 9%	0.9 ± 1.3
Mu548		*A.carbonarius*	70% ± 6%	8.8 ± 2.5
2		*Streptomyces sp.*	96% ± 7%	ND
3		*Streptomyces sp.*	0% ± 12%	ND
9		*Streptomyces sp.*	0% ± 7%	ND
10		*Streptomyces sp.*	96% ± 8%	ND
11		*Streptomyces sp.*	22% ± 12%	ND
12		*Streptomyces sp.*	95% ± 9%	ND
15		*Streptomyces sp.*	92% ± 13%	ND
16		*Streptomyces sp.*	95% ± 11%	ND

[a] Initial concentration of ZEA of 10 µg/ml for *Streptomyces sp.* and initial concentration of ZEA of 50 µg/ml for *Aspergillus sp.*; 7 days of incubation at 28°C

[b] ZEA sulfate production was estimated from the HPLC-fluorescence peak assuming that this compound had identical fluorescence yield as ZEA, ND: Non Detected.

Kinetics of ZEA removal for different initial ZEA concentrations

Transformation of ZEA by growing the *A. niger* CA936 isolate was tested for different concentrations of ZEA (5, 10, 50, 100, 150 µg/ml). For each tested concentration, ZEA was removed (Fig. 1). For initial ZEA concentration of 5 and 10 µg/ml, total removal of ZEA was observed after 24h of incubation. For initial ZEA concentration of 50, 100, 150 µg ml^{-1}, maximal ZEA removal was observed after 72h of incubation with respectively 87%, 72% and 88% of ZEA removal.

Chemical determination of ZEA product

Transformation of ZEA by growing *A. niger* CA936 isolate was followed by HPLC. For initial ZEA concentration of 50, 100 and 150 µg/ml, when the ZEA peak (30.2 min) decreased, an unknown peak appeared at 11 min (Fig.2.A). It increased with incubation time of *A. niger* CA936 isolate and with initial ZEA concentration. This peak probably corresponded to a ZEA product. Its UV spectra (Fig. 2.B) was similar to the ZEA one with a shift in two bands. The maximal absorption band of 236 nm in ZEA was shifted to 228 nm in the product, whereas the band at 274 nm in ZEA was observed at 260 nm in the unknown product. To determine the detailed chemical structure of this compound, it was purified and its accurate mass was determined by LC/MS/MS. Two m/z major signals were observed at 317.139 and 397.096 which respectively corresponded to ZEA and ZEA product. Molar

mass of the product was higher than the ZEA one suggesting that the product observed is a ZEA conjugate. A zoom on the isotopic masses of 397.096 made it possible to determine the compound formula: $C_{18}H_{21}O_8S$. The conjugate produced by *Aspergilli* isolates was a ZEA-sulfate (Fig.3). It was confirmed by enzymatic ZEA-sulfate hydrolysis. In fact, after the action of glucuronidase and sulfatase commercial enzymes, the ZEA HPLC peak increased while the ZEA-sulfate HPLC peak disappeared.

Conversion of ZEA to ZEA-sulfate

Considering a similar molar absorption coefficient in HPLC for ZEA-sulfate and ZEA, potential production of ZEA-sulfate was evaluated on the eighteen isolates listed in Table 1. *A. niger* isolates were shown to be more efficient to produce ZEA-sulfate than other *Aspergillus* isolates. The most efficient isolate was GX312 producing on average 15.6 µg/ml of ZEA-sulfate after seven days incubation from an initial ZEA concentration of 50 µg/ml. No ZEA-sulfate was obtained after ZEA removal by species of *Streptomyces*. Considering the conjugate mass obtained by accurate mass measure (i.e. 397.096), molar concentration of conjugate produced was compared to molar concentration of ZEA. ZEA was removed concomitantly with conjugate apparition (Fig.4). From 24h of incubation, ZEA concentration began to decrease since ZEA-sulfate appeared. After 96h of incubation, about 100 µM of ZEA was removed since 51.5 µM of ZEA-sulfate was recovered i.e. only 51.5% of ZEA-sulfate was recovered compared to the removed ZEA.

MCF-7 proliferation in presence of ZEA-sulfate

Maximal proliferation indexes or PE on MCF-7 cells were obtained for E_2 and ZEA at a concentration of 1 nM and were respectively of 2.61 ± 0.02 and 1.61 ± 0.11. Supernatants of growing *A. niger* CA936 incubated in a 50 µg/ml ZEA contaminated medium, from initial incubation time to 96h, were then tested (Fig. 5). For both dilutions of 10,000 and 100,000 fold, a significant decrease was observed from initial time to 96h of incubation time. For example, for a 100,000 fold diluted sample, the proliferation ratio was from 1.38 ± 0.01 for initial incubation time to 1.13 ± 0.03 for supernatant obtained from 96h of incubation. So, incubation of ZEA with growing *A. niger* CA936 isolate for 96h allowed reduction of about 20% of the initial global toxicity in the culture medium. MCF-7 cells were finally cultivated in the presence of purified ZEA-sulfate. Proliferation was then measured from 1 pM to 1 µM of ZEA and ZEA-sulfate. A significant diminution of proliferation was obtained from ZEA to ZEA-sulfate (Fig. 6). ZEA-sulfate induced less cell proliferation. For example, at 1 µM, proliferation induced by ZEA was of 1.9 ± 0.09 since that induced by ZEA-sulfate was of 1.16 ± 0.18. ZEA sulfonation allowed toxicity reduction of 40%.

DISCUSSION

16 among 18 isolates tested (*Aspergillus sp.* and *Streptomyces sp.*) were able to remove ZEA (resp. 50 µg/ml and 10 µg/ml), using agitation, after seven days at 28°C. *Aspergillus sp.* and *Streptomyces sp.* are well known to have high metabolic capacities (Bodie *et al.*, 1994; Horinouchi *et al.*, 2007). So, it is not surprising that most isolates tested had a ZEA eliminating metabolism. *Aspergillus* section Nigri isolates were especially chosen for that screening because previous experiments showed that conidia from these genus were able to adsorb ZEA (Jard *et al.*, in press) and OTA and that their mycelium could transform ochratoxin A in ochratoxin α (Bejaoui *et al.*, 2005). For example, growing MuX44 isolate could also remove 80% of OTA from CYA medium contaminated with 2 µg/ml. A hypothesis was that some of these isolates were not only able to adsorb ZEA on conidia but also to transform it.

Initial ZEA concentration measured was less important than theoretically added ZEA concentration. It could be explained by a ZEA binding on CA936 *A. niger* conidia (Jard *et al.*, in press). After 24h of incubation, while conidia were transformed into mycelium, a decrease of ZEA concentration was observed, indicating the beginning of the transformation.

Isolates of *A. niger* were found, in our study, to be able to transform ZEA into ZEA-sulfate. Many indications led to this result. First, accurate mass of the ZEA product was higher than the ZEA one (resp. 397.096 and 317.139). So the transformation was not a ZEA hydrolyse as it was for other studies (Takahashi-Ando *et al.*, 2002) but a conjugation. Secondly, the conjugate was more polar than ZEA according to its retention time in HPLC (resp. 11 min and 30.2 min). It could be a glucuronide or sulfate conjugate especially because of the fact that the action of commercial sulfatase and glucuronidase on purified ZEA products led to ZEA recovery. Then, UV spectra profiles of ZEA conjugate make us think that a sulfate group was present in the compound. Shifts observed in conjugate UV spectra maxima compared to ZEA spectra could be attributed to the electron-withdrawing effect of a sulfate group (Barron *et al.*, 1988). Finally, the determination of ZEA-sulfate formula was made by accurate mass measurement.

To describe the reaction involved, a comparison between molar concentration of ZEA removed and ZEA-sulfate produced was performed and it showed that less than 50% of molar quantity was not quantified. But no other common ZEA product like α or β-zearalenol was observed. Quantification of ZEA-sulfate was performed using the molecular mass of the compound and a standard curve of mass concentration of ZEA. This difference between the molar concentration of ZEA removed and ZEA-sulfate produced could also be explained by a ZEA-sulfate absorption coefficient smaller than the ZEA one at λex of 275 nm. At λex of 260 nm, the HPLC ZEA-sulfate fluorimetric response was 1.7 times higher than at λex of 275 nm. ZEA response was maximal at λex of 275 nm whereas the ZEA-sulfate response maximum shifted. Concentration of ZEA-sulfate was thus under-estimated and so it was coherent that nearly 50% of molar quantity was not quantified.

Estrogenic toxicity of ZEA-sulfate was evaluated using a MCF-7 cell proliferation assay. PE values were in accordance to previous studies (Minervini *et al.*, 2005). Incubation of ZEA with growing *A. niger* CA936 isolate decreased the estrogenicity of the medium. No synergism of toxicity was observed by the presence of ZEA and ZEA-sulfate simultaneously. Then, ZEA-sulfate only was tested on its ability to let proliferated MCF-7 cells. A significant decrease of cell proliferation was observed from ZEA to ZEA-sulfate, indicating that ZEA-sulfate is less oestrogenic than ZEA. The under-estimation of ZEA-sulfate concentration enhanced this phenomenon. It is known that ZEA is able to bind on estrogen receptors by mimicking β-estradiol conformation (Gaumy *et al.*, 2001). Sulfate addition on ZEA changed its characteristics (conformation and polarity) and certainly prevented this conjugate to bind on estrogen receptors and thus to induce proliferation of MCF-7 cells. Similarly, it was shown that sulfonated β-estradiol, estrogen hormone, was not able to bind on MCF-7 estrogen receptors (Falany *et al.*, 2002). Further *in vivo* experiments will be necessary to know if ZEA-sulfate retains the biological properties of ZEA when ingested by animals. In a previous study, Plasencia and Mirocha (1991) showed that ZEA-4-sulfate produced by *Fusarium sp.* had less estrogenic toxicity than the ZEA using rat uterus enlargement bioassay. The stability of *A. niger* sulfate conjugate during digestion must be tested.

Mirocha *et al.* (1981) showed that ZEA-sulfate was excreted in urine by bovine. Bovine seems to have the capacity to sulfonate ZEA. Other xenobiotic compounds, especially phenolic compounds, could be sulfonated by a variety of organisms like fungi, *Streptomyces sp.*, rats, mammals and humans (Cerniglia *et al.*, 1982; Ibrahim and Abul-Hajj, 1989; Falany *et al.*, 1995; Rikke and Roy, 1996; Nagata and Yamazoe, 2000; Blanchard *et al.*, 2004). Sulfonation in mammals was known to be a classic way of detoxification (phase II drug-metabolizing enzyme system) and excretion of xenobiotic compounds especially steroids (Luu-The *et al.*, 1996). It leads to more water-soluble products and thereby aiding their excretion via the kidneys or bile (Gamage *et al.*, 2006). In human

metabolism of drugs, three steps occur with sulfonation (Falany *et al.*, 1997) and one is sulfate activation by adenosine-tri-phosphate (ATP) (Robbins and Lippman, 1956). ZEA and E have similar conformations and they could be sulfonated. Estrogen sulfotransferase catalyzes the specific sulfonation of β-estradiol at the 3'-hydroxyl position (Falany *et al.*, 1997). The two studies on sulfonation of ZEA led to the formation of ZEA-4-sulfate (El-Sharkawy *et al.*, 1991; Plasencia and Mirocha, 1991). There may be one type of sulfotransferases able to transfer sulfates on the 4-ZEA position and the 3'-hydroxyl E position. A nuclear magnetic resonance analysis of sulfate conjugate formed by growing *A. niger* CA936 will be performed to know on which phenolic group sulfate was added.

Some experiments are in progress to transform *in vitro* ZEA into ZEA-sulfate by *A. niger* CA936 isolate crude extracts in the presence of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS). Identification and purification of enzymes involved in sulfonation should be performed. This work could lead to an efficient means of ZEA detoxification in animal feed. Even if neither ochratoxin A nor fumonisin B2 were detected by LC/MS analysis after incubation of *A. niger* chosen isolate, it could not be admitted to add directly this strain in animal feed. Indeed, *A. niger* is considered to have toxic effects. However, if responsible enzymes are be purified in the future, it would be conceivable to add an enzymatic solution to animal feed to decrease toxic effects of mycotoxins. Stability in the digestive tract of this ZEA-sulfate must be determined to be sure that ZEA would not be recovered in animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors especially thank Dr. Pierre Galtier for fruitful discussions, Christophe Junot (CEA Saclay) for accurate mass analysis and "Evialis" (Saint-Nolff, France) for financial support.

REFERENCES

Barron, D., Varin, L., Ibrahim, R. K, Harborne, J. B. and Williams, C. A., 1988. Sulphated flavonoids-an update. Phytochemistry 27: 2375-2395.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2005. Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 8224-8229.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2006. Black *Aspergilli* and ochratoxin A in French vineyards. International Journal of Food Microbiology 111: S46-S52.

Blanchard, R. L., Freimuth, R. R., Buck, J.,Weinshilboum,R. M. and Coughtrie, M. W. H., 2004. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. Pharmacogenetics 14: 199–211.

Bodie, E.A., Bower, B., Berka, R.M. and Dunn-Coleman, N.S., 1994. Economically important organic acid and enzyme products. In: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (ed.) *Aspergillus*: 50 Years On. Elsevier, Amsterdam, pp. 561-602.

Bottalico, A., Logrieco, A. and Visconti, A., 1989. *Fusarium* species and their mycotoxins in infected corn in Italy. Mycopathologia: 107: 85-92.

Cerniglia, C.E., Freeman, J.P. and Ronald, K.M., 1982. Glucuronide and sulfate conjugation in the fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology 43: 1070-1075.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report 139. CAST, Ames, IA, USA, pp. 199.

El Sharkawy, S.H., Abul-Hajj, Y., 1987a. Microbial transformation of zearalenone 1. Formation of zearalenone 4-b-glucoside. Journal of Natural Products 50: 520-521.

El Sharkawy, S.H. and Abul-Hajj, Y., 1987b. Microbial transformation of zearalenone 2. Reduction, hydroxylation, and methylation products. Journal of Organic Chemistry 53: 515-519.

El Sharkawy,S.H. and Abul-Hajj, Y., 1988. Microbial clivage of zearalenone. Xenobiotica 18: 365-371.

El Sharkawy, S.H., Mustafa, I.S., Mohamed S.A. and Halaweish, F.T., 1991. Microbial transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. Applied and Environmental Microbiology 57: 449-552.

Falany, J.L., Krasnykh, V., Mikheeva, G., Falany C.N., 1995. Isolation and expression of an isoform of rat estrogen sulfotransferase. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 52: 35-44.

Falany, C.N., 1997. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. FASEB Journal 11: 206-216.

Falany, J.L., Macrin, N. and Falany, C.N., 2002. Regulation of MCF-7 breast cancer cell growth by β-estradiol sulfatation. Breast Cancer Research and Treatment 74: 167-176.

Fink-Gremmels, J. and Malekinejad, H., 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. Animal Feed Science and Technology 137: 326-341.

Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C. and Buhr, M.M., 1989. Measurement of the relative affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology 94: 691-694.

Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., and McManus, M.E., 2006. Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. Toxicological Science 90: 5-22.

Gaumy, J-L., Bailly, J.D., Burgat, V. and Guerre, P., 2001. Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. Revue Médicale Vétérinaire 152: 219-234.

Gromadzka, K., Chelkowski, J., Popiel D., Kachlicki, P., Kostecki, M. and Glinski, P., 2009. Solid substrate bioassay to evaluate the effect of *Trichoderma* and *Clonostachys* on the production of zearalenone by *Fusarium* species. World Mycotoxin Journal 2: 45-52.

Horinouchi, S., 2007. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 71: 283-299.

Ibrahim, A. and Abul-Hajj, Y., 1989. Aromatic hydroxylation and sulfonation of 5'-hydroxyflavene by *Streptomyces fulvissimu*. Applied and Environmental Microbiology 55 : 3140-3142.

Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A. and Lebrihi, A., in press. Adsorption of zearalenone by *Aspergillus japonicus* conidia: new trends for biological ZEA decontamination in animal feed. World Mycotoxin Journal DOI n° 10.3920/WMJ2008.1128.

Kamimura, H., 1986. Conversion of zearalenone to zearalenone glycoside by *Rhizopus sp.* Applied and Environmental Microbiology 52: 515-519.

Llorens, A., Mateo, R., Mateo, J. J., Jiménez, M. 2002. Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. Food Additives & Contaminants: Part A 19: 272-280.

Luu-The, V., Bernier, F. and Dufort, I., 1996. Steroid sulfotransferases. Journal of Endocrinology 150: S87-97.

McMullen, J.R., 1977. Microbiological reduction of zearalenone and related compounds. U.S. patent 4,004,978.

Minnervini, F., Giannoccaro, A., Cavallini, A. and Visconti, A., 2005. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. Toxicological Letters 159: 272-283.

Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Robison, T.S., 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. Food and Cosmetic Toxicology 19: 25-30.

Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. and Prillinger, H., 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. Systematic and Applied Microbiology 27: 661-671.

Nagata, K., and Yamazoe, Y., 2000. Pharmacogenetics of Sulfotransferase. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 40: 159–176.

Plasencia, J. and Mirocha, C.J., 1991. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium spp*. Applied and Environmental Microbiology 57: 146-150.

Rikke, B. A., and Roy, A. K., 1996. Structural relationships among members of the mammalian sulfotransferase gene family. Biochemistry and Biophysics Acta 130: 331–338.

Robbins, P.W. and Lippman, F., 1956. Identification of enzymatically active sulfate as adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate. Journal of American Chemical Society 78: 2652-2653.

Shirling, E. B. and Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology 16: 313-340.

Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Kakeya, H., Osada, H. and Yamaguchi, I., 2002. A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning. Biochemistry Journal 365: 1-6.

Takahashi-Ando, N., Tokai, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I. and Kimura, M., 2005. Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. Applied Microbiology and Biotechnology 67: 838-844.

Utermark, J. and Karlovsky, P., 2007. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. Applied Environmental Microbiology 73: 637-642.

FIGURES

Figure 1. Removal of ZEA by *A. niger* CA936 from CYB contaminated by ZEA at 5 (circle), 10 (square), 50 (closed triangle), 100 (cross) and 150 µg/ml (closed square).

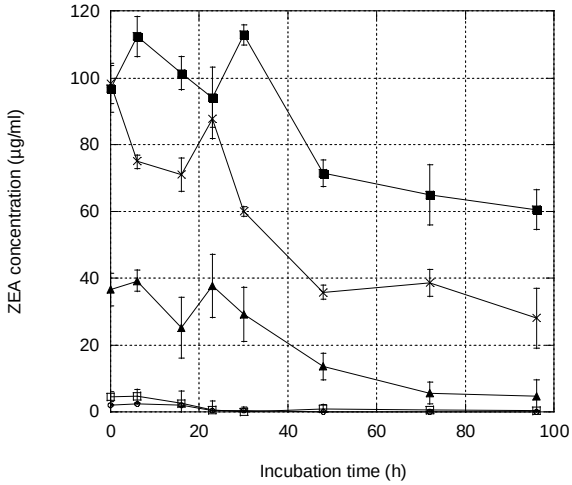
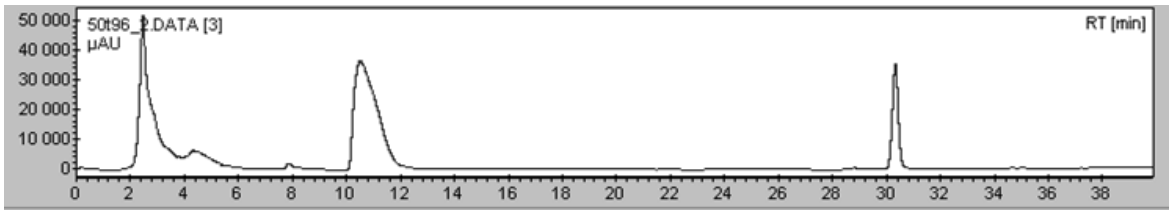


Figure 2. Example of an HPLC chromatogram (Fluo: λex=275 nm; λem=450 nm) (A.) and UV spectra corresponding to ZEA-sulfate (line) and ZEA (dotted line) (B.) obtained from the incubation of growing *A. niger* CA936 isolate in a 150 µg/ml contaminated medium.

A.



B.

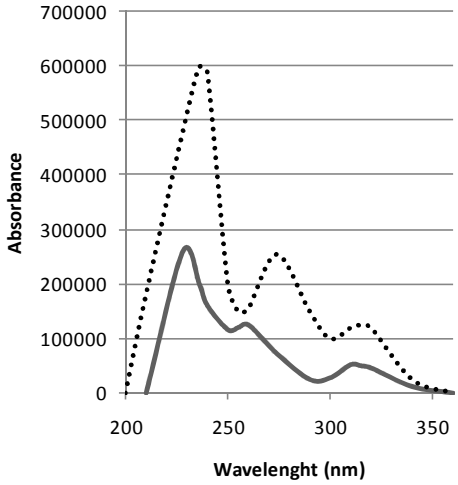
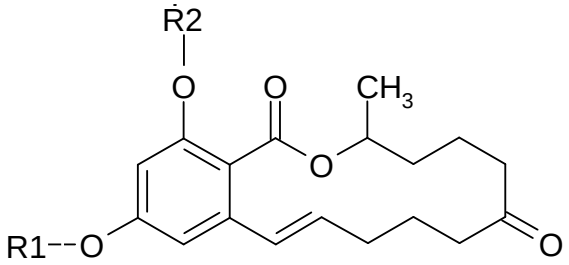


Figure 3. Chemical structure of ZEA-sulfate.



R1 : SO_3^- and R2 : H or R1 : H and R2 : SO_3^-

Figure 4. Transformation of ZEA (open circles) to ZEA-sulfate (closed circles) by growing *A. niger* CA936 on CYB contaminated by 50 µg/ml of ZEA (i.e. 150 µM). ZEA sulfate production was estimated from the HPLC-fluorescence peak assuming that this compound had identical fluorescence yield as ZEA.

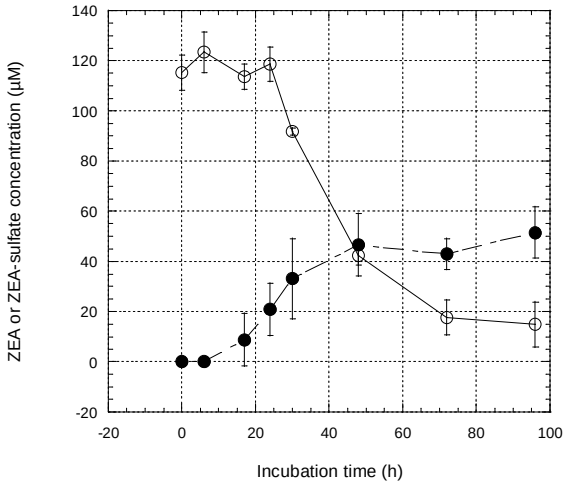
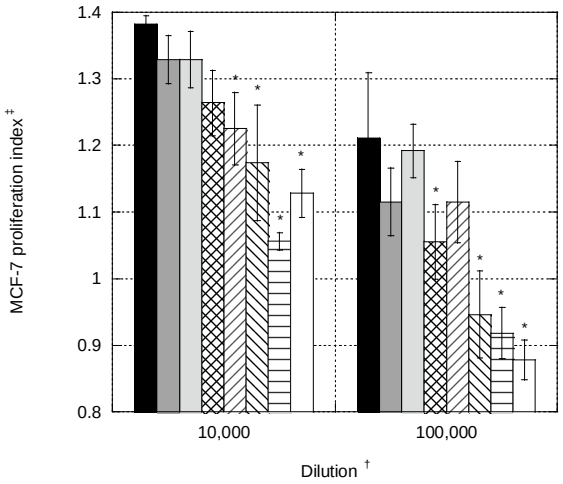
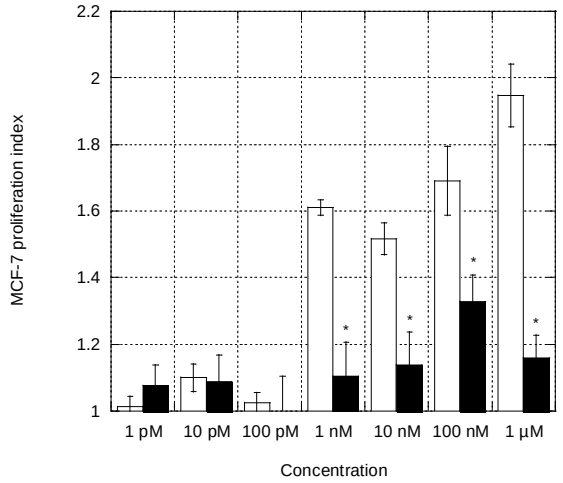


Figure 5. Proliferation indexes of MCF-7 cells evaluated in the presence of supernatants of CA936 isolate incubated with 50 µg/ml of ZEA for different incubation time (Initial time (■), 6h (▒), 17h (□), 24h (X), 30h (//), 48h (\\), 72h (=), 96h (□)).



* : Values significantly different from initial incubation time ($p<0.05$).
‡: The proliferation index was determined by calculating the ratio of the optical density value that was obtained with the tested product to that of the negative control.
†: Samples were diluted 10,000 and 100,000 fold corresponding to a ZEA concentration at initial time of 16 nM and 1.6 nM.

Figure 6. Proliferation of MCF-7 cells cultured in the presence of ZEA (□) and ZEA-sulfate (■) at different concentrations.



* : Values significantly different from ZEA-sulfate

Annexe III: Tables de détermination des elements par analyse ESCA

Etabli à partir de http://www.lasurface.com/database/elementxps.php

Composé	Energie de Liaison (eV)	Différence d'énergie observée (eV)
C-C, C-H	288	0
C-N	289	1
C-OH, C-O-C	289,7	1,7
C=N	290,5	2,5
C=O, N-C=O	291,2	3,2
-CO-O	292,2	4,2
O-CO-O	293,5	5,5

Annexe IV: Principe détaillé de la mesure de potentiel zéta

L'analyse du potentiel zéta a été effectuée par l'appareil ZetaSizerNano, Malvern Instruments.

Un champ électrique est appliqué entre 2 électrodes dans une cellule fermée contenant une suspension du matériau à tester. Le principe est de mesurer la vitesse des particules dans ce champ électrique. Nous pouvons ainsi avoir accès à la mobilité électrophorétique puis à la charge de surface ou potentiel zéta. Cette mesure est effectuée par effet Doppler. La lumière diffusée par les particules en mouvement présente un décalage en fréquence par rapport à la lumière non diffusée. En mesurant cette différence de fréquence, la vitesse des particules et donc la mobillité électrophorétique peut être mesurée grâce à l'Equation 1.

Equation 1 :

$\mu = \frac{V}{E}$, μ : mobilité électrophorétique µm.cm/V.s, V : vitesse en µm/s, E : champ électrique en V/cm.

Grâce à une approximation possible en milieu aqueux, le potentiel zéta est exprimé comme suit sur l'Equation 2.

Equation 2 :

$\zeta = 11{,}23.\mu$ avec ζ : potentiel zéta en mV et μ : mobilité électrophorétique en µm.cm/V.s

Avant de démarrer une série d'analyses, il faut s'assurer que le « phase plot » est correct (cf Figure A). Il représente le comportement des particules pour des fréquences de variation de champ électrique très rapide puis de variation de champ électrique très lente. La vitesse est donc ensuite calculée par rapport à la pente de chacune de ces réponses. Pour une fréquence de variation de champ faible, la résolution est meilleure.

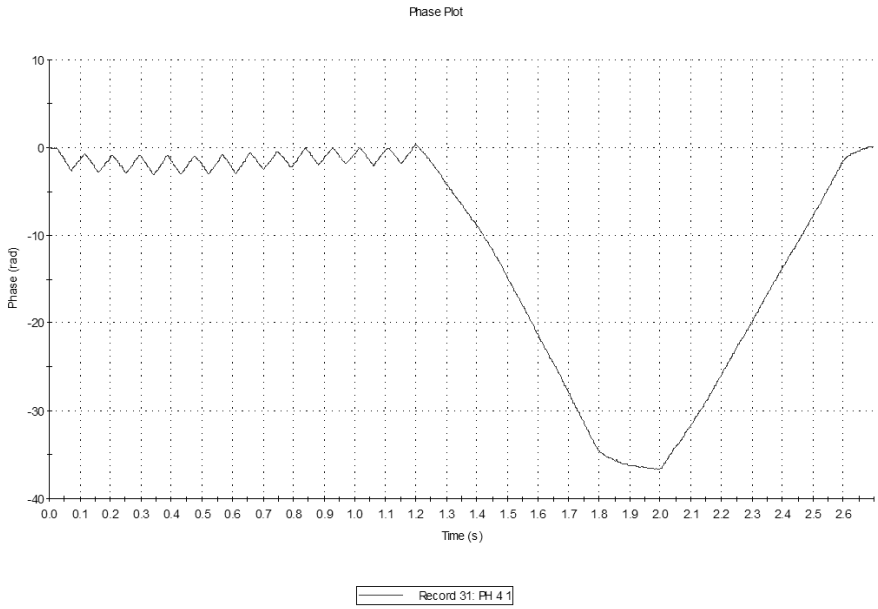


Figure A : Phase plot obtenue pour la mesure de potentiel zéta sur les spores.

La distribution du potentiel zéta est ensuite calculée (cf Figure B).

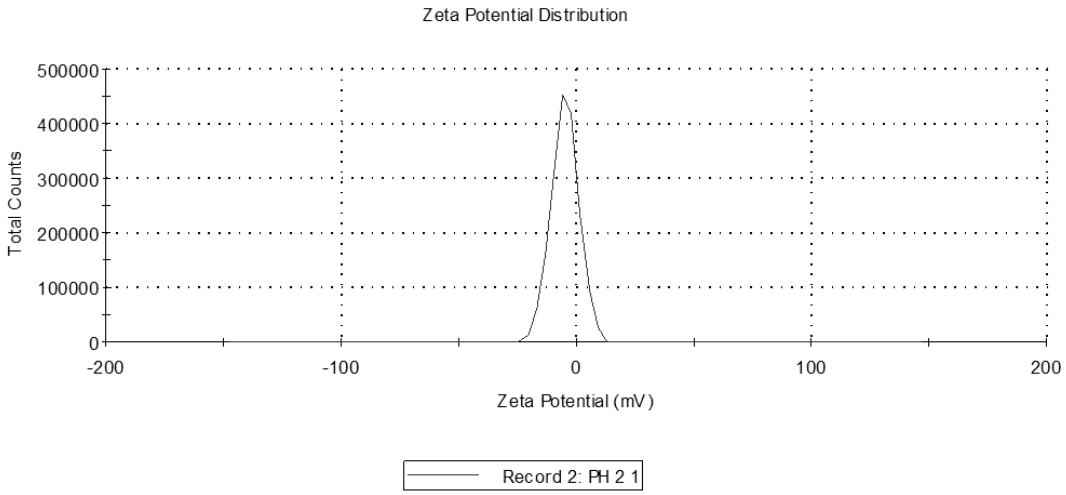


Figure B : Distribution du potentiel zéta

Résumé

De nombreuses espèces de moisissures (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*…) produisent des molécules toxiques appelées mycotoxines. Malgré des efforts agronomiques croissants, la contamination en mycotoxines dans les produits agricoles est toujours présente. Des stratégies de décontamination sont alors utiles pour limiter l'impact des mycotoxines sur la santé animale ou humaine. La première stratégie que nous avons étudiée est le piégeage par adsorption de mycotoxines sur des spores d'*Aspergillus* de la section Nigri. Nous avons démontré que les spores vivantes sont aussi efficaces que les spores inactivées à la chaleur, indiquant que les composés responsables de l'adsorption ne sont pas altérés par ce traitement. Le phénomène d'adsorption semble être principalement du à des interactions hydrophobes. Des études restent à faire sur l'efficacité d'un tel procédé *in vivo* et pour caractériser les composés responsables. La deuxième stratégie étudiée a été la biotransformation d'une mycotoxine particulière, la zéaralénone. Plusieurs microorganismes ont été testés. Parmi eux, il a été démontré que certaines espèces d'*Aspergillus* avaient la capacité de transformer la zéaralénone en zéaralénone-sulfate. La toxicité de ce composé a été évaluée par test de prolifération de cellules cancéreuses MCF-7. Ces cellules ont la particularité de proliférer en présence de composés oestrogéniques. Il a été montré que la zéaralénone-sulfate provoquait peu de prolifération chez ces cellules, suggérant une toxicité plus faible que la zéaralénone. Des études seront effectuées pour évaluer la stabilité d'un tel conjugué *in vivo*.

MOTS CLES: mycotoxines; zéaralénone, *Aspergillus*; adsorption; transformation.

Abstract

Several species of fungi (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*…) are producers of very hazardous mycotoxins. Despite the use of recommended agricultural practices to avoid mold development and mycotoxinogenesis during crop growth, harvesting and storage, contamination by mycotoxins still occurs. Decontamination procedures are useful to reduce the mycotoxin content of contaminated raw materials. The first strategy we studied was to decrease the bioavailability of mycotoxins trapping them with binding agents. For the first time, the adsorption of mycotoxins by conidia of black *Aspergilli* has been demonstrated. Heat-treated conidia are as efficient as living conidia, which demonstrates that the components involved in adsorption are not affected by heat-treatment. The adsorption phenomenon seems to involved hydrophobic interactions. Further *in vivo* studies are necessary to develop the application of such a decontamination process to contaminated raw materials and feeds. The second strategy studied was the biodegradation of zearalenone by microorganisms which could offer a pratical and efficient method to alleviate negative effects on animals. For the first time, some *Aspergillus niger* strains, isolated from grapes, have been shown to transform zearalenone to zearalenone-sulfate. To be sure that zearalenone biotransformation leads to a detoxification, the estrogenic toxicity of zearalenone-sulfate was determined by cell culture studies. An estrogen receptor positive breast cancer cell line (MCF-7) was used to confirm the lost of toxicity by E-screen assay. The test principle is based on the fact that MCF-7 cells proliferate in presence of estrogenic substances. Zearalenone-sulfate was less estrogenic than zearalenone. Further work will focus on the stability of the zearalenone-sulfate *in vivo*.

KEYWORDS: mycotoxins; zearalenone, *Aspergillus*; adsorption; transformation.