THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale de biodiversité, agriculture, alimentation, environnement, terre, eau

Unité de recherche : le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) – UMR QualiSud

En partenariat international avec l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Université de Monastir, TUNISIE

Titre de la thèse :

Étude de la prévalence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie et de leur réduction par des bioproduits *in vivo*

Présentée par Amina ALOUI

Le 18/12/2023

Sous la direction de Pr. Samir ABBES
et Dr. Catherine BRABET

Devant le jury composé de

Salwa ABID, Professeur, Faculté de Médecine dentaire de Monastir	Présidente
Mondher MEJRI, Professeur, Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja	Rapporteur
Florence MATHIEU, Professeure, INP-ENSAT, Toulouse	Rapporteur
Alexandre COLAS-DE-LA-NOUE, Professeur, Université de Montpellier- UMR Qualisud	Examinateur
Samir ABBES, Professeur, Institut supérieur de biotechnologie de Monastir	Directeur de thèse
Catherine BRABET, Cadre scientifique, UMR Qualisud-CIRAD	Directrice de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻

"Nul ne peut atteindre l'aube sans passer par le chemin de la nuit"

Jubran Khalil Jubran

✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻✻

Dédicaces

Je dédie cette thèse …✍

A ma chère mère et mon cher père, que ce travail soit l'expression de ma profonde reconnaissance pour le soutien moral et matériel que vous m'avez toujours apporté tous les deux. Merci d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, pour les valeurs que vous m'avez transmises et de m'avoir offert une vie pleine de moments heureux.

A mes frères et ma sœur, que ce travail soit le témoignage de mon profond attachement et de ma sincère fraternité. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon fiancé, pour son amour, son soutien constant et aide sans failles dans les moments de doutes et de stress. Que Dieu te protège et procure santé, réussite et longue vie. Je t'aime de tout mon cœur.

A mes amis et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail

Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance

A toute ma famille et à tous ceux que j'aime

✍AMINA

Remerciements

Alors que je termine les dernières pages de ce manuscrit, j'aimerais exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé tout au long de ce projet de thèse. Il y a eu de nombreuses rencontres qui m'ont permis d'élargir mes connaissances, et je suis reconnaissante a beaucoup de gens. Je tiens donc à m'excuser par avance auprès de tous ceux que je n'ai pas eu la gentillesse de mentionner.

A mon Dieu, avant toute chose, pour m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier fortement mes deux directeurs de thèse, ***Dr. Samir ABBES,*** *professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir et* ***Dr. Catherine BRABET,*** *chercheuse à l'UMR QUALISUD, Montpellier, France, à l'égard des efforts pénibles qu'ils ont éprouvés pour pouvoir accomplir cette thèse. Pour leur grande disponibilité et de m'avoir fait bénéficier de ses compétences, ses reconnaissances et ses suggestions. Que cette thèse soit le témoignage de mon profond respect et mon immense reconnaissance.*

Mes plus chaleureux remerciements vont à ma co-encadrante ***Dr. Jalila BEN SALAH-ABBES,*** *Maître de conférences à l'ISBM, à l'égard de sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique ainsi que ses hautes qualités humaines, ses encouragements inlassables, son amabilité et sa gentillesse. Elle m'a toujours réservé le meilleur accueil, malgré ses obligations professionnelles. Elle mérite toute mon admiration.*

Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à ***Pr. Didier MONTET****, chercheur à l'UMR QUALISUD, Montpellier, France qui ma diriger durant les 2 première années de ma thèse. Je tiens à lui faire ma profonde gratitude pour le temps qu'il m'a consacré, ses discussions, ses conseils et sa disponibilité. Merci également à tous les membres de l'équipe de CIRAD, UMR QUALISUD, Montpellier, France, plus particulièrement,* ***Dr. Noel DURAND*** *et* ***Dr. Jean-Christophe MEILE****. J'ai pour eux tout le respect qu'impose leurs côtés humains, savoirs et compétences*

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude et ma profonde appréciation à ***M. Imed MESSAOUDI,*** *Professeur et Directeur du Laboratoire de "Génétique, Biodiversité et Valorisation des Bio-ressources" à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, de m'avoir accueilli dans son équipe. J'ai pour lui le plus grand respect pour son côté humain, ses connaissances et ses capacités ; il trouvera ici ma profonde gratitude.*

Je voudrais également adresser mes plus sincères remerciements à ***Dr. Abdellah Zinedine,*** *Professeur à l'université de Chouaib Doukkali, Maroc et* ***Dr. Amar Riba****, professeur au laboratoire de biologie des systèmes microbiens, Algérie, membres de projet PHC Maghreb, pour ses aides précieuses*

J'ai eu l'occasion de faire partie de deux unités de recherche tout au long de cette thèse de cotutelle : le laboratoire Génétiques, Biodiversité et valorisation de bio-ressources (GBVB), Monastir, Tunisie et le CIRAD UMR QUALISUD, Montpellier, France. J'aimerais remercier les membres de deux unités de m'avoir accueillie parmi eux.

Je tiens par ailleurs à remercier Isabelle ***Piro-Metayer,*** *technicienne au CIRAD UMR QUALISUD pour son aide précieuse et sa disponibilité. Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et mes profonds respects.*

Je tiens à remercier sincèrement les membres du jury de leur participation à l'évaluation de mon travail.

Merci également à tous les membres du laboratoire « Génétique, Biodiversité et valorisation des Bio-ressources » auquel j'appartiens en particulier les techniciens ***M. Nabil*** *et* ***Mme Sawssen****. Je vous remercie sincèrement pour votre gentillesse, votre patience et votre aide au cours de la réalisation de ce travail.*

Mes sentiments les plus profonds et remerciements infinis à ***Amira ABBASSI, Aicha ELJAI et Tiziri BADJI*** *pour les relations amicales, conviviales, fraternelles et professionnelles qu'elles ont su créer durant ma thèse. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite une bonne continuation.*

J'adresse mes vifs remerciements et ma profonde gratitude à mes collègues ***Hela, Khawla, Marwa, khouloud, Haifa, Maha, Nesrine et Asma*** *pour ses encouragements permanent, ses aides et ses soutiens morals.*

Merci à vous tous

AMINA

Tables des matières

Liste des abréviations……1

Liste des figures 4

Liste des tableaux 7

Liste des travaux scientifiques 9

INTRODUCTION GENERALE.....13

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 18

I. Les mycotoxines 18

I.1. Définition.....18

I.2. Les champignons toxinogènes 18

I.3. La mycotoxicose 19

I.4. Les réglementations des mycotoxines 20

I.5. Les mycotoxines émergentes.....22

I.6. Les facteurs influençant la mycotoxinogenèse 23

I.7. La prévalence des mycotoxines 25

I.8. Les aflatoxines 28

I.9. La zéaralénone 32

I.10. L'ochratoxine A 35

II. Le tractus gastro-intestinal : la première cible des mycotoxines ingérées 37

II.1. La structure et la fonction du tractus gastro-intestinal.....37

II.2. Établissement de la flore microbienne 39

II.3. Les fonctions de la flore microbienne.....40

II.4. Le système immunitaire associé à l'intestin.....42

III. Les méthodes de réduction du risque des mycotoxines : Bonnes pratiques culturales et additifs alimentaires 43

III.1. La prévention au champ.....43

III.2. La prévention pendant la récolte 44

III.3. La prévention post-récolte.....44

III.4. Les méthodes de détoxification des mycotoxines 44

IV. Les bactéries lactiques 47
IV.1. Définition des bactéries lactiques 47
IV.2. Activités bénéfiques des bactéries lactiques 48
IV.3. Interaction bactéries lactiques/ mycotoxines 48
V. Les argiles 49
V.1. Généralité 49
V.2. Interaction argiles-mycotoxines 50
MATERIEL 53
I. Matériel biologique 53
I.1. Les échantillons de blé dur 53
I.2. Les souris 53
I.3. Les bactéries 53
I.4. Les lignées cellulaires 54
I.5. L'argile 54
II. Les produits et les réactifs chimiques utilisés pour l'analyse multi-mycotoxines des échantillons de blé dur 54
METHODES 55
I. Étude de la présence des mycotoxines dans les échantillons de blé dur 55
I.1. Collecte des échantillons de blé dur en Tunisie 55
I.1.1. Régions d'étude 55
I.1.2. Les points et les procédures de collecte le long de la filière blé dur 56
I.2. Teneur en eau 58
I.3. Activité de l'eau 59
I.4. Analyse multi-mycotoxines 59
I.4.1. Extraction des mycotoxines 59
I.4.2. Détection et quantification des mycotoxines 59
I.5. Estimation de l'apport quotidien en mycotoxine et le facteur de risque sur le consommateur tunisien 63
II. Étude in vitro 63

II.1. Interaction LAB (LP et LB) / mycotoxines (AFB1, AFM1, OTA et ZEN) en fonctions de différents facteurs 63
II.2. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction du temps d'incubation 64
II.3. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de l'état des bactéries (viables/non viables) 64
II.4. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de la concentrations bactériennes.....65
II.5. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction du pH du milieu 65
II.6. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de la présence des cofacteurs (NaCl, $MgCl_2$ et $CaCl_2$) 65
II.7. Interaction LAB (LP, LB et LR) / mycotoxine (ENB) en fonction de plusieurs facteurs 66
III. Détermination de la CI50 de la bentonite et de L. plantarum MON03 sur plusieurs lignées cellulaires.....66
IV. Évaluation de la toxicité et de l'effet préventif de la BT et de la LP contre l'AFB1 et la ZEN inductrices de la fragmentation d'ADN et de l'apoptose sur les cellules Caco-2 67
V. Étude in vivo : Évaluation in vivo du pouvoir de détoxification des mycotoxines (AFM1, AFB1 et ZEN) par les LAB et/ou l'argile (bentonite).....71
V.1. Évaluation du pouvoir préventif de Lactobacillus rhamnosus GAF06 (LR), de bentonite (BT) et de mélange LR/BT vis-à-vis de la toxicité de l'AFM1.....71
V.2. Évaluation du pouvoir préventif de Lactobacillus plantarum MON03 (LP), de bentonite (BT) et de mélange LP/BT vis-à-vis de la toxicité de l'AFB1 et la ZEN 81
CHAPITRE I : Prévalence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie.....84
I. Activité de l'eau et teneur en eau des échantillons de blé dur.....85
II. Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé 85
II.1. Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020 85
II.2. Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021 89
III. Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé 90
III.1. Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020 90
III.2. Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021 91

IV. Pratiques culturales utilisées pour les échantillons de blé collectés en 2020 et 2021 ……92

V. Estimation de l'apport quotidien en mycotoxines et le facteur de risque sur le consommateur tunisien.....92

CHAPITRE II : Capacité des bactéries lactiques a adsorber/absorber les mycotoxines in vitro 93

I. Interaction LAB (LP et LB) / mycotoxines (AFB1, AFM1, OTA et ZEN).....94

I.1. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines par LAB en fonction du temps d'incubation 94

I.2. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines par LAB en fonction de l'état des LAB (viables/non viables).....94

I.3. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction des concentrations bactériennes.....95

I.4. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction du pH du milieu 96

I.5. Evaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de la présence des cofacteurs (NaCl, $MgCl_2$ et $CaCl_2$) 97

II. Interaction LAB (LP, LB et LR) / mycotoxine (ENB) en fonction de différents facteurs…. 99

CHAPITRE III : Étude de la toxicité de Lactobacillus plantarum MON03 et de l'argile de type bentonite sur des lignées cellulaires et de leur capacité à protéger les cellules Caco-2 contre la génotoxicité induite par l'AFB1 et la ZEN.....101

I. Étude de la cytotoxicité de la bentonite et de la L. plantarum MON03 par détermination de leur CI_{50} chez certaines lignées cellulaires.....102

II. Évaluation de la toxicité et de l'effet préventif de la BT et de la LP contre l'AFB1 et la ZEN inductrices de la fragmentation d'ADN et de l'apoptose sur les cellules : Caco-2.103

II.1. Résultats de fragmentation d'ADN sur électrophorèse.....103

II.2. Analyse quantitative de la fragmentation d'ADN 104

II.3. Mesure de l'activité caspase-3.....105

CHAPITRE IV : Évaluation in vivo du pouvoir de détoxification des mycotoxines (AFM1, AFB1 et ZEN) par les LAB et/ou la bentonite.....107

I. Pouvoir préventif de L. rhamnosus GAF06 et/ou bentonite vis-à-vis l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et l'immunotoxicité de l'AFM1 in vivo 108

I.1. Étude de la toxicité générale 108

I.1.1. Effet sur la létalité 108

I.1.2. Effet sur le refus du repas 108

I.1.3. Effet sur le gain de poids 109

I.2. Étude des paramètres biochimiques.....110

I.3. Détermination du statut oxydant/antioxydant au niveau du foie et du rein 111

I.3.1. Effets sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD) 111

I.3.2. Effets sur l'activité de la catalase (CAT).....112

I.3.3. Effets sur la teneur en malondialdéhyde (MDA) 113

I.3.4. Effets sur les teneurs en protéines sulfhydriles (PSH) 113

I.4. Effet sur l'Index splénique et l'index thymique 114

I.5. Effet sur la viabilité des thymocytes et des splénocytes 114

I.6. Effet sur les sous-types de cellules immunitaires et sur le profil d'immunoglobulines115

I.7. Étude histologique du foie et du rein 118

II. Pouvoir préventif de Lactobacillus plantarum MON03 vis-à-vis la reprotoxicité de l'AFB1 et la ZEN in vivo 120

II.1. Étude de la toxicité générale 120

II.1.1. Effet sur la létalité 121

II.1.2. Effet sur le gain de poids 121

II.2. Effet sur la Concentration, la viabilité, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes….....121

DISCUSSION 126

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 143

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....146

Liste des abréviations

AFs : Aflatoxines

AFB1 : Aflatoxine B1

AFG1 : Aflatoxine G1

AFG2 : Aflatoxine G2

AFM1 : Aflatoxine M1

AFSSA : Agence Française de sécurité sanitaire des aliments

ALP : Phosphatase Alcaline

ALT : Alanine Amino-Transférase

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

AST : Aspartate Amino-Transférase

AU : Acide Urique

CAT : Catalase

Chl : Cholestérol

CIRC : Centre International de la Recherche sur le Cancer

CPB : Tampon citrate phosphate

DON : Déoxynivalénol

EC MRM Q : Energie de collision MRM quantification

EC MRM q : Energie de collision MRM qualitative

ENs : Enniatines

ENA : Enniatines A

ENA1 : Enniatines A1

ENB : Enniatines B

ENB1 : Enniatines B1

EROS : Espèces Réactives d'oxygène

EO : Eosinophile

ERE : Éléments de réponse aux œstrogènes

ESR : Récepteurs aux Œstrogènes

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FB1 : Fumonisine B1

FB2 : Fumonisine B2

FUM : Fumonisine

FUS : Fusaproliférine

GB : Globules Blancs

GPx : Glutathion Peroxydase

GR : Globule Rouge

GRAS : Generally recognized as safe

GSH : Glutathion

H_2O_2 : Eau Oxygénée

HCT : Hématocrite

HGB : Hémoglobine

HSCAS : Hydrate sodium calcium aluminosilicates

IL : Interleukine

LAB : Bactérie lactique

LDH : Lactate déshydrogénase

LC- MS/MS : Chromatographie liquide couplé à 2 spectromètres de masse

LR : *Lactobacillus rhamnosus* GAF06

LP : *Lactobacillus plantarum* MON03

LB : *Lactobacillus paracasei* BEJ01

MDA : Malonaldéhyde

MON : Moniliformine

MRM Q : Reaction multiple quantitative

MRM qual : Reaction multiple qualitative

MTT : Bromure de 3(4,5-dimméthylthiazole-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium

OTA : Ochratoxine A

PBS : Tampon phosphate salin

R2 : Coefficient de corrélation

p.c : poids corporel

PSH : Protéine sulfhydrile

PT : Protéine totale

SOD : Superoxyde Dismutase

TGI : Tractus Gastro-intestinal

UHPLC : Chromatographie en phase liquide ultra-haute-performance

UHPLC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide ultra-haute-performance avec spectrométrie de masse en tandem

ZEN : Zéaralénone

α, β -ZAL : α,β-Zéaralénol

α, β -ZEL : α,β-Zéaralénol

Liste des figures

Figure 1: Structure des enniatines. (A) Structure cyclohexadepsipeptidique générale, (B) Nature chimique des groupements R1, R2 et R3, (C) Structures chimiques des groupements de sec-butyl et iso-propyl (Olleik et al., 2019). 23

Figure 2: Les facteurs influençant la croissance des champignons et la production des mycotoxines. 25

Figure 3: Vue d'ensemble de l'appareil digestif et de la digestion. 38

Figure 4: Mécanisme fondamental de la fonction digestive. 38

Figure 5: Composition et concentration des espèces microbiennes le long du tube digestif....40

Figure 6: Rôles du microbiote intestinal (Landman and Quévrain 2016). 42

Figure 7: Stratégies de prévention et de détoxification des mycotoxines. 43

Figure 8 : Les régions de collecte des échantillons de blé dur.....56

Figure 9: Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines totale. 73

Figure 10: Principe de dosage de l'activité SOD. 74

Figure 11: Principe de dosage de l'activité CAT. 75

Figure 12 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des PSH (GSH : Glutathion réduit).....77

Figure 13: Pourcentage d'élimination d'AFB1 et d'AFM1 par LP viables en fonction du nombre des cellules du milieu. Moyenne ± SD de trois essais.....96

Figure 14: Pourcentage d'élimination de ZEN et d'OTA par LB viables en fonction du nombre des cellules du milieu. Moyenne ± SD de trois essais.....96

Figure 15: Pourcentage d'élimination d'AFB1 et d'AFM1 par LP viables en fonction de pH du milieu. Moyenne ± SD de trois essais. 97

Figure 16: Pourcentage d'élimination de ZEN et d'OTA par LB viables en fonction de pH du milieu. Moyenne ± SD de trois essais. 97

Figure 17: Effets d'enrichissement de milieu de culture en NaCl, MgCl2, et CaCl2 de la souche LP après 6 h d'incubation. Moyenne ± SD de trois essais. 98

Figure 18: Effets d'enrichissement de milieu de culture en NaCl, MgCl2, et CaCl2 de la souche LB après 6 h d'incubation. Moyenne ± SD de trois essais. 98

Figure 19: Détermination de la CI50 de la BT en présence des C5-O, des Véro, des Hep G2, des Caco-2 et des leucocytes par le test MTT.....102

Figure 20: Détermination de la CI_{50} de la LP en présence des C5-O, des Véro, des Hep G2, des Caco-2 et des leucocytes par le test MTT.....103

Figure 21: Fragmentation d'ADN sur gel d'agarose chez les cellules Caco-2 induite par la ZEN (A) et par l'AFB1 (B) et rôle préventif de la BT et de la LP. 104

Figure 22: Fragmentation d'ADN chez des cellules Caco-2 incubées en présence de la ZEN (A) et l'AFB1 (B) et rôle préventif de la BT et de la LP. Moyenne±SD de trois exemplaires.....105

Figure 23: Activité caspase-3 dans les cellules Caco-2 induite par la ZEN (A) et l'AFB1 (B) et rôle préventif de la BT et de la LP. Moyenne±SD de trois exemplaires. 106

Figure 24: Effet des différents traitements sur la consommation alimentaire des souris. 109

Figure 25: Effet du traitement sur le poids des souris Balb/c. 109

Figure 26: Activité de la SOD au niveau du foie (A) et du rein (B) des souris témoins, traitées par la LR, BT, AFM1, AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT.....112

Figure 27: activité de la catalase (CAT) au niveau du foie (A) et du rein (B) des souris témoins, traitées par la LR, BT, AFM1, AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT.....112

Figure 28: Taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA) au niveau du foie (A) et du rein (B) des souris témoins, traitées par la LR, BT, AFM1, AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT.....113

Figure 29: Teneurs en protéines thiols (µg/mg de protéines) au niveau du foie (A) et du rein (B) des souris témoins, traitées par la LR, BT, AFM1, AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT. 114

Figure 30: Effets des différents traitements sur l'index splénique et l'index thymique des souris. 114

Figure 31: Effets des différents traitements sur la viabilité des splénocytes et des thymocytes des souris.....115

Figure 32: Effet des différents traitements sur les pourcentages de lymphocytes T dans le sang, CD3+, CD4+ (A) et CD8+, CD56+ (B). Les données indiquées sont des moyennes ± SD. (*) Significatives (P<0,05), (**) Non significatives (P<0,05). 117

Figure 33: Effet de la BT ou de la LR seules et en combinaison sur les concentrations sériques d'IgG et d'IgA chez les souris traitées par l'AFM1. Les données présentées sont des moyennes ± SD. (*) Significative (P<0,05), (**) non significative (P<0,05).....118

Figure 34: Observation microscopique du tissu hépatique des souris témoins (A), exposées à la LR (B), à la BT (C), à l'AFM1 (D et E) et aux mélanges AFM1+ LR (F), AFM1+BT(G) et AFM1+LR+BT(H) pendant 10 jours (HE, G×40). (V : veine Centro-lobulaire, I : infiltration lymphocytaire, Cg : Congestion). 119

Figure 35: Observation microscopique du tissu rénal des souris témoins (A), exposées à la LR (B), à la BT (C), à l'AFM1 (D et E) et aux mélanges AFM1+LR (F), AFM1+BT(G) et AFM1+LR+BT(H) pendant 10 jours (HE, G×40). (G : Glomérule, HJG : Hypertrophie de l'appareil juxta-glomérulaire, TP : Tube contourné proximal, TD : Tube contourné distal, Cg : Congestion, I : Infiltration lymphocytaire, DT : dilatation tubulaire, AGL : accumulation des gouttelettes de lipides). 120

Figure 36: Effet des traitements sur le poids des souris Balb/c. 121

Figure 37: Étude de la concentration (A), de la mobilité (B) et de la viabilité (C) des spermatozoïdes chez des souris adultes traitées par l'AFB1 et la ZEN seules et par le mélange AFB1+ZEN+ LP et/ou BT et chez des souris témoins.....123

Figure 38: Morphologie des spermatozoïdes : normale, anomalies totales, anomalies de la tête et anomalies de la queue chez les souris traitées par l'AFB1 et la ZEN seules ou le mélange AFB1+ZEN+LP et/ou BT.....124

Liste des tableaux

Tableau 1: Effets toxiques des principales mycotoxines (AFSSA, 2009).....20

Tableau 2: Teneurs maximales autorisées en mycotoxines dans les céréales et produits dérivés, définies par le règlement (UE) 2023/915 (Commission européenne 2023). 21

Tableau 3: Occurrence des mycotoxines dans les céréales et produits dérivés des pays d''Afrique du Nord (Algérie, Egypte et Maroc). 26

Tableau 4: Occurrence des mycotoxines dans les céréales et produits dérivés consommés en Tunisie. 27

Tableau 5: Nombre d'échantillons de blé dur collectés en Tunisie en 2020 et 2021 dans les deux régions climatiques, Béja et Kairouan. 53

Tableau 6: Nombre d'échantillons élémentaires à prélever en fonction du poids du lot de céréales et de produits dérivés (Commission européenne, 2006). 57

Tableau 7: Les paramètres analytiques pour l'analyse multi-mycotoxines des échantillons de blé 61

Tableau 8: Activité de l'eau et teneur en eau des échantillons de blé collectés en 2020 et 2021. 85

Tableau 9: Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020. 86

Tableau 10: Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021.....89

Tableau 11: Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020..91

Tableau 12: Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021..91

Tableau 13: Pratiques culturales utilisées pour les échantillons de blé collectés en 2020 et 2021. 92

Tableau 14: Apport quotidien en mycotoxines (PDI). 92

Tableau 15: Pourcentage d'élimination des mycotoxines par les LAB à l'état vivante. 94

Tableau 16: Pourcentage d'élimination des mycotoxines par les LAB viables et non viables (traitées par la chaleur et par le HCl).....95

Tableau 17: Pourcentage d'élimination d'ENB par les LAB viables et non viables à pH 3.5 .99

Tableau 18: Pourcentage d'élimination d'ENB par les LAB viables et non viables à pH 7.5 100

Tableau 19: La CI50 de la BT et de la LP mesurée par la technique MTT après 48h d'exposition des leucocytes, des Caco-2, des C5-O, des HepG2 et des Véro. 103

Tableau 20: Effets des différents traitements sur les paramètres biochimiques. 111

Tableau 21: Effet de traitement par l'AFM1, LR ou de BT seule ou en association avec l'AFM1 sur le nombre des sous-types des leucocytes. Les données indiquées sont des moyennes ± SD. (*) Significatives (P<0,05), (**) Non significatives (P<0,05).....116

Liste des travaux scientifiques

Publications de Recherche

1. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Jean Christophe Meile, Amar Riba, Noel Durand, Didier Montet, Samir Abbès, Catherine Brabet. Occurrence of pre- and post-harvest multi-mycotoxins in durum wheat grains collected in 2020 and 2021 in two climatic regions of Tunisia. **Food Additive and Contaminants: Part B**, Juin 2023, 16(3), p.274-287. https://doi.org/10.1080/19393210.2023.2219996

2. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Noel Durand, Jean Christophe Meile, Didier Montet, Catherine Brabet, Samir Abbès. Prevention and Detoxification of Mycotoxins in Human Food and Animal Feed using Bio-resources from South Mediterranean Countries: a Critical Review. **Critical Reviews in Toxicology**, Juin 2023, 53(2), p.117-130. https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2211178

3. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Hela Belgacem, Haifa Dhif, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Jean Christophe Meile, Noel Durand, Catherine Brabet, Samir Abbès (2023). AFM_1 exposure in male balb/c mice and intervention strategies against its immuno-physiological toxicity using clay mineral and lactic acid bacteria alone or in combination. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, Décembre 2023, p. 1-32. https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2300299

4. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Noel Durand, Didier Montet, Catherine Brabet, Samir Abbès. Mycotoxin detoxification using lactic acid bacteria and clay mineral mixture. Soumis dans le journal **Toxicology in vitro**.

Participations à des congrès internationaux

Communication orale :

1. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Jean Christophe Meile, Amar Riba, Noel Durand, Catherine Brabet, Samir Abbès. Interaction of aflatoxin B1 and zearalenone in male mice causes immuno and reprotoxicity: Possible protective role using lactic acid bacteria and bentonite mixture, 10 èmes Journées Internationales

Scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie, Hammamet, Tunisie, 28-30 octobre 2023.

2. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Noel Durand, Didier Montet, Catherine Brabet, Samir Abbès. Potential protective effect of a lactic acid bacteria and bentonite mixture against AFM1 causing immunotoxicity and oxidative stress in male mice, 2èmes journées internationales 'Biodiversité, Environnement et santé', Monastir, Tunisie, 05-07 Mai 2023.
3. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Aicha EL Jai, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Noel Durand, Didier Montet, Catherine Brabet, Samir Abbès. Etude de la prévalence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie et de leur réduction par des bio-produits in vivo, 4ème Journées du Partenariat Hubert Curien Maghreb, Sousse, Tunisie, 07-08 décembre 2022.
4. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Aicha EL Jai, Amar Riba, Noel Durand, Abdellah Zinedine, Catherine Brabet, Didier Montet, Samir Abbès. Multi-mycotoxin occurrence of wheat grain collected from coastal and continental regions in Tunisia, 9ème Edition des Journées Mycotoxines, Marseille, France, 22-23 septembre 2022.
5. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Aicha EL Jai, Amar Riba, Noel Durand, Abdellah Zinedine, Catherine Brabet, Didier Montet, Samir Abbès. Occurrence des mycotoxines dans le blé et stratégies de prévention en Tunisie, sous le thème « Mycotoxines et sécurité sanitaire des aliments au Maghreb », 1er workshop franco-maghrébin, El Jadida, Maroc, 20 juillet 2022.
6. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Hela Belgacem, Aicha EL Jai, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Noel Durand, Catherine Brabet, Didier Montet, Samir Abbès. Evaluation of Bentonite and *Lactobacillus plantarum MON03* mixture to mitigate ZEN and AFB1 effects on Caco-2 cells, sous le thème « Food Safety and Microbiology », 9èmes Journées Internationales Scientifiques de l'Association Tunisienne de Toxicologie, Hammamet, Tunisie, 12-14 mars 2022.

- ❑ Posters :

1. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Aicha EL Jai, Amar Riba, Noel Durand, Didier Montet, Samir Abbès, Catherine Brabet. Study of the occurrence of 22 mycotoxins in Tunisian durum wheat: « A second year investigation » and potential for their reduction in vitro, the international biotechnology days (IDB 2022)

of the Tunisian association of biotechnology, Hammamet, Tunisie, 19-22 décembre 2022.

2. **Amina Aloui**, Jalila Ben Salah-Abbès, Abdellah Zinedine, Amar Riba, Noel Durand, Catherine Brabet, Didier Montet, Samir Abbès. Ability of Bentonite-*Lactobacillus rhamnosus* GAF06 mixture to mitigate Aflatoxin M1 damages in Balb/c mice', 43rd Mycotoxin workshop, Toulouse, France, 30 mai –1 juin 2022.

Participation à des congrès scientifiques en ligne :

1. MycoKey 2020, Final International Conference on-line: "Integrated and innovative key actions for mycotoxin management in the food and feed chain", Bari, Italie, 19-21 octobre 2020.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de champignons filamenteux microscopiques (moisissures) appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* qui contaminent une large gamme de denrées agricoles végétales (céréales, arachides, café, cacao, raisins, épices, etc.) au champ et après la récolte , notamment pendant le stockage (Cotty and Jaime-Garcia 2007 ; Rogowska et al., 2019). Ces substances toxiques, du fait de leur résistance aux traitements physique et chimique, peuvent également être présentes dans les aliments transformés d'origine végétale, mais aussi par transfert dans le lait, les œufs, la viande et les abats d'animaux ayant consommé des aliments contaminés. Ces toxines sont donc des contaminants naturels des aliments tout au long des filières agroalimentaires. L'invasion fongique et la synthèse des mycotoxines dans les aliments dépendant de plusieurs facteurs, en particulier de la température, l'humidité relative et l'activité de l'eau. Les pratiques culturales jouent également un rôle important dans la détermination de la présence des champignons et de leurs toxines (Awuchi et al., 2021; Babalola et al., 2022; Hoffmans et al., 2022 ; Daou et al., 2021; Ramesh, Bhat, and Vasanthi 2003).

Les mycotoxines constituent une préoccupation mondiale majeure en matière de santé publique en raison de leurs effets toxiques variés pour l'homme et les animaux. De plus, elles entraînent d'énormes pertes économiques (Ozden, Akdeniz, and Alpertunga 2012; Paterson and Lima 2010; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002; Wu 2006). La co-occurrence de mycotoxines dans le même aliment se produit presque toujours et peut ainsi conduire à une toxicité plus importante en raison d'effets additifs ou synergiques possibles (Alassane-Kpembi et al., 2017; Grenier et al., 2011).

Pour protéger la santé des consommateurs, certains pays ont fixé des teneurs maximales en mycotoxines dans les aliments (Van Egmond et al., 2007), avec les limites les plus strictes établies par la Commission européenne 2023/915. Les aflatoxines (AFs), l'ochratoxine A (OTA), les fumonisines (FUM), le déoxynivalénol (DON), la zéaralénone (ZEN), la patuline (PAT) et la citrinine sont les principales mycotoxines réglementées (Commission européenne 2023), puisque ce sont les mycotoxines les plus importantes du point de vue agroalimentaire et sanitaire, compte tenu de leur présence dans les denrées alimentaires et de leur toxicité pour l'homme et les animaux. En plus, il y a deux toxines de *Fusarium* : Toxine T-2 et l'hydroxy-T-2 (HT-2) sont fréquemment trouvées dans les céréales et les produits à base de céréales et à cause de leurs toxicités, l'union européenne à émettre en 2013, des recommandations sur leurs

niveaux indicatifs dans les aliments destinés à l'alimentation humaine et animale (Commission européenne 2013). Par ailleurs, au cours de la dernière décennie, il y a eu une augmentation de l'occurrence des mycotoxines émergente de *Fusarium* dans le monde entier. Ce sont des mycotoxines qui ne font pas l'objet d'une surveillance systémique ni d'une réglementation, telles que la beauvéricine (BEA), les enniatines (ENs), la moniliformine (MON) et la fusaproliférine (FUS) (Fraeyman et al., 2017; Jestoi 2008).

Les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les mycotoxines sont les céréales, l'un des problèmes les plus graves qui affectent leur sécurité sanitaire et leur qualité. En Tunisie, le blé dur est l'aliment de base pour la population et la céréale la plus cultivée sur environ 700 000 hectares, principalement dans le nord du pays (Bensassi et al., 2010). La production nationale a été estimée à 753 696 tonnes en 2021 (MARHP, 2021). La Tunisie est un pays méditerranéen qui a des conditions favorables pour la croissance des moisissures toxinogènes et pour la production de toxines dans les céréales. Des études ont montré la présence de mycotoxines dans les grains de blé dur tunisiens : le DON et la ZEN, avec respectivement 83% et 23% du total des échantillons collectés dépassant les limites européennes pour le blé dur brut (DON : 1750 µg/kg; ZEN : 100 µg/kg) (Bensassi et al., 2010; Zaied et al., 2012b); les ENs (fourchette : 25000-931000 µg/kg) et la citrinine (fourchette : 1-170 µg/kg) (Chakroun et al., 2022; Zaied et al., 2012a). Des AFs ont également été signalées dans des échantillons de blé (4/46) avec la présence de l'aflatoxine B1 (AFB1) dans tous les échantillons contaminés à des concentrations variant de 0.12 à 18 µg/kg (Ghali et al., 2010).

De plus, l'évaluation de l'exposition aux mycotoxines est une étape cruciale dans l'évaluation des risques des agents microbiologiques présents dans les aliments. Il s'agit d'une base théorique largement reconnue pour évaluer la qualité et la sécurité sanitaire des produits alimentaires (Ding et al., 2015). L'exposition aux mycotoxines d'une population est estimée en combinant les concentrations en mycotoxines dans les aliments avec les données de consommation alimentaire (Udovicki et al., 2021).

Pour réduire la contamination des aliments par les mycotoxines, des méthodes physiques, chimiques et biologiques ont été développées. Une approche efficace de détoxification des mycotoxines doit éliminer les mycotoxines sans laisser de résidus toxiques ni altérer la qualité organoleptique, la valeur nutritionnelle et la digestibilité des aliments (Pankaj, Shi, and Keener 2018). Des études ont été menées sur l'utilisation d'agents de détoxification pour réduire les mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal (Abbès, Ouanes, et

al., 2007; Abbès, Salah-Abbès, Sharafi, et al., 2012a; Król et al., 2018; Salah-Abbès et al., 2016; Abdellah Zinedine et al., 20 07a; Złoch et al., 2020).

Les bactéries lactiques (LAB) constituent une voie prometteuse pour éliminer les mycotoxines. Elles produisent des substances ayant une activité antifongique et capables d'inhiber la croissance des moisissures toxinogènes (Dalié et al., 2010; Shehata et al., 2018, 2019). De plus, elles ont la capacité à inhiber la production des mycotoxines, à biodégrader et/ou à séquestrer les mycotoxines (Lahtinen et al., 2004; V Niderkorn et al., 2006; Belkacem-Hanfi et al., 2014; Elsanhoty et al., 2014). Au niveau intestinal, les LAB diminuent la biodisponibilté des mycotoxines, ce qui réduit potentiellement leurs effets toxiques (Hathout and Aly 2014; Khalil et al., 2015).

De plus, en raison des propriétés adsorbantes élevées de certaines argiles, des études ont montré que leur ajout à des régimes alimentaires contaminés par les mycotoxines réduit significativement la biodisponibilité de ces dernières. Le mode de liaison est basé sur les interactions intermoléculaires (liaisons hydrogènes, ioniques ou forces de van der Walls) dépendantes des propriétés électrostatiques et hydrophobiques de l'agent adsorbant et des mycotoxines cibles mais aussi de leur géométrie (plane ou non-plane) (Laurain & Rodriguez, 2019; EFSA, 2017). Les argiles de type bentonite (BT) sont des aluminosilicates cristallins hydratés de cations alcalins et alcalino-terreux. Ce sont des phyllosilicates de structure TOT, c'est-à-dire constitués de feuillets comportant deux couches tétraédriques (SiO_4) tête-bêche, liées entre elles par une couche octaédrique (AlO_4). Les feuillets sont liés entre eux par les cations interfoliaires, le plus souvent calcium ou sodium. L'espace interfoliaire d'environ 1,25 nm, la surface spécifique entre les feuillets qui peut atteindre jusqu'à 800 m^2/g, et l'existence des cations interfoliaires (Na^+, Ca^{2+} …), confèrent à ce type d'argiles des propriétés d'adsorption et d'échange d'ions (Laurain and Rodriguez 2019). Ceci rend les bentonites des adsorbants potentiels des métaux lourds, des polluants organiques et des mycotoxines (Vekiru et al., 2007). De plus, lorsqu'elles sont utilisées à un niveau maximum de 20 g/kg comme complément alimentaire, les argiles ne présentent aucun risque pour la santé animale (EFSA, 2017).

C'est dans ce contexte que se présentent mes travaux de thèses centrés sur l'étude de la contamination du blé par les mycotoxines en Tunisie, et sur la réduction de cette contamination *in vivo* et *in vitro* par l'utilisation de bio- produits (argile / bactéries lactiques) afin de répondre aux objectifs suivants :

1. Détermination des principales mycotoxines contaminant le blé en Tunisie ;

2. Evaluation *in vitro* du pouvoir adsorbant/absorbant des mycotoxines par les LAB et/ou l'argile ;
3. Evaluation *in vivo* du pouvoir de détoxification des mycotoxines par les LAB et/ou l'argile.

Ainsi, ce manuscrit est commencé par une synthèse bibliographique sur les mycotoxines, leur contamination des filières agroalimentaires, en particulier celle des céréales, leur présence dans les céréales et les produits dérivés des payes d'Afrique du Nords, en particulier la Tunisie, et les méthodes de prévention et de détoxification des mycotoxines. Puis, une description détaillée de matériels et de méthodes expérimentales utilisés. Ensuite, le manuscrit de thèse est structuré en 4 chapitres qui répondent aux objectifs déjà mentionnés. Le premier chapitre décrit l'occurrence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie et les facteurs critiques pour cette contamination ainsi que l'évaluation du risque pour la population tunisienne. Le deuxième chapitre décrit le pouvoir préventif de 3 *Lactobacillus, L. plantarum* MON03, *L. paracasei* BEJ01 et *L. rhamnosus* GAF06 vis-à-vis de la réduction de mycotoxines les plus fréquemment trouvées dans le blé dur tunisien. Le troisième chapitre est une étude de la toxicité de *L. plantarum* MON03 et l'argile de type bentonite sur des lignées cellulaires et la capacité de ces 2 bioproduits à protéger les cellules Caco-2 contre la génotoxicité induite par l'AFB1 et la ZEN. Le quatrième chapitre est consacré pour l'évaluation du pouvoir de détoxification des mycotoxines (AFM1, AFB1 et ZEN) *in vivo* par l'utilisation de bioproduits (LAB et/ou bentonite). Ce chapitre étudie le pouvoir préventif de *L. rhamnosus* GAF06 et/ou de la bentonite vis-à-vis de l'hépatotoxicité, de la néphrotoxicité et de l'immunotoxicité de l'AFM1. De plus, le pouvoir préventif de *L. plantarum* MON03 et/ou de la bentonite vis-à-vis de la reprotoxicité de l'AFB1 et la ZEN est étudié. Le manuscrit est clôturé par une discussion des résultats obtenus, une conclusion générale et des perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les mycotoxines

I.1. Définition

Les mycotoxines ont un faible poids moléculaire et elles peuvent être toxiques pour les consommateurs après ingestion, même à de faibles concentrations (Chen et al., 2020). Elles sont sécrétées par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Marin et al., 2013). Les mycotoxines sont classées comme des métabolites secondaires parce qu'elles sont le plus souvent synthétisées à la fin de la phase de croissance et au début de la phase stationnaire des champignons. Ce sont des molécules faiblement solubles dans l'eau qui résistent aux traitements physiques et chimiques (Bennett and Klich 2013). Ces mycotoxines sont produites lorsqu'un ensemble de conditions environnementales au champ, à la récolte, ainsi que pendant le transport et le stockage sont réunis (Cotty and Jaime-Garcia 2007 ; Rogowska et al., 2019 ; Kosicki et al., 2016).

Les principales mycotoxines qui préoccupent le monde sont les AFs, l'OTA, la PAT, les trichothécènes, les FUM et la ZEN. La toxicité varie d'une mycotoxine à l'autre, et le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même, mais peut également provenir des métabolites de cette toxine et des effets combinés en cas de multi-contamination (synergiques, additifs ou antagonistes) (Alassane-Kpembi et al., 2017; Grenier et al., 2011).

I.2. Les champignons toxinogènes

Les champignons forment le règne des Fungi. Ce sont des microorganismes eucaryotes constitués d'un réseau d'hyphes (mycélium) et produisent des spores. Ceci implique un potentiel de contamination très important. Ils sont présents dans le sol, l'air, l'eau et dans une large variété des aliments d'origine végétale et animale.

On distingue deux groupes de champignons toxinogènes. Un groupe est constitué de champignons hygrophiles ou de champ qui secrètent des mycotoxines dites de champ sur la denrée agricole. Ce groupe se développe à une activité d'eau élevée (supérieure à 0.9), notamment *Fusarium spp.* Un deuxième groupe produit des toxines après récolte, notamment pendant le stockage, appelées toxines de stockage. Ce sont des moisissures dites « xérophile » ayant une activité d'eau faible (0.7), notamment les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium.*

Les genres de moisissures les plus souvent associés à la production des mycotoxines sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Binder et al., 2007; Marin et al., 2013).

I.3. La mycotoxicose

L'exposition aux mycotoxines se traduit par des pathologies et des perturbations métaboliques appelées mycotoxicoses. La toxicité des mycotoxines dépend de la molécule impliquée, de la durée d'exposition et de la quantité absorbée. Les mycotoxines peuvent provoquer chez l'homme des intoxications aiguës (forte dose à court terme)) ou chroniques (faible dose à long terme) qui peuvent induire un cancer ou des déficiences immunitaires… etc.

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont été menées afin de déterminer certains effets nocifs des mycotoxines sur la santé humaine et animale. En effet, le risque de production de ces composés chimiques augmente partout dans le monde. Certaines mycotoxines sont hépatotoxiques et cancérogènes (AFs), d'autres sont œstrogéniques (ZEN), immunotoxiques (PAT, trichothécènes, FUM) ou néphrotoxiques (OTA) (Alshannaq and Yu 2017; Edite Bezerra da Rocha et al., 2014) (Tableau 1).

Les AFs et leurs métabolites sont les substances les plus toxiques. Elles sont cytotoxiques, génotoxiques, mutagènes, immunosuppresseurs, neurotoxiques et cancérigènes. Elles sont classées par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) dans le groupe 1 « cancérogène pour l'homme ». La zéaralénone est connue pour ses effets œstrogéniques et perturbateurs de la fonction reproductrice chez plusieurs espèces animales. Ayant une structure similaire à l'œstrogène, elle rentre en compétition avec l'estradiol 17β pour les sites de liaison des récepteurs œstrogènes (Turcotte, Hunt, and Blaustein 2005; Abdellah Zinedine et al., 2007a). Elle est également génotoxique, immunotoxique et affecte certains paramètres hématologiques et biochimiques (Belgacem et al., 2019; Ben Salah-Abbès et al., 2008).

La FB1 est un inhibiteur compétitif de la céramide synthase, une enzyme clef dans la synthèse des sphingolipides (Luttgeharm, Cahoon, and Markham 2016; Soriano, González, and Catalá 2005). Elle est néphrotoxique, neurotoxique et hépatotoxique chez les animaux, et elle a été classée par le CIRC dans le groupe 2B « possible cancérogène pour l'homme ».

L'OTA est facilement absorbée par le tractus gastro-intestinal. Elle a une forte affinité pour la protéine plasmatique (Bouaziz et al., 2008). Elle est considérée comme le principal agent causal de la néphropathie endémique des Balkans (Abid et al., 2003). Elle peut également causer une néphropathie interstitielle chronique, une génotoxicité, car elle induit la formation d'adduit d'ADN et provoque la cancérogénicité (Malir et al., 2016).

La PAT est connue pour contaminer des fruits comme les pommes, les raisins et le jus (Rharmitt et al., 2016; Zaied et al., 2013; Zouaoui et al., 2015). Il s'agit d'une lactone polycétine qui peut causer la congestion et l'œdème des vaisseaux sanguins et des tissus pulmonaires,

hépatiques et intestinaux. Elle présente une toxicité très aiguë chez les animaux exposés à des doses élevées et provoquent des infections gastro-intestinales (Vidal et al., 2019). En outre, elle peut induire une cancérogénicité chez les enfants et les adultes qui boivent de grandes quantités de jus de fruits, en particulier de jus de pomme (Malir et al., 2016).

Tableau 1: Effets toxiques des principales mycotoxines (AFSSA, 2009)

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

I.4. Les réglementations des mycotoxines

Face aux risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire (en particulier, les céréales brutes et les produits céréaliers), les instances sanitaires européennes et d'autres pays ont établi des doses limites maximales réglementaires pour certaines mycotoxines En effet, les mycotoxines qu'on peut les retrouver dans les céréales et les produits céréaliers et qui sont réglementées sont les AFs, le DON, l'OTA, les FUM (FUMB1 et FUMB2) et la ZEN (Tableau 2).

Tableau 2: Teneurs maximales autorisées en mycotoxines dans les céréales et produits dérivés, définies par le règlement (UE) 2023/915 (Commission européenne 2023).

Produits	**Mycotoxines**	**Teneur maximale réglementaire (µg/kg)**
Céréales et produits dérivés des céréales destinées à la consommation humaine directe (adultes)	AFB1	2
	Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	4
Maïs et riz destinés à être soumis à un tri ou à un autre traitement physique avant d'être mis sur le marché pour le consommateur final ou pour une utilisation comme ingrédients de denrées alimentaires	AFB1	5
	Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	10
Aliments pour bébés et préparations à base de céréales destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge	AFB1	0.1
	Aflatoxines B1 + B2 + G1 + G2	-
Céréales non transformés	OTA	5
Produits dérivés de céréales destinés à la consommation humaine directe		3
Aliments pour bébés et préparations à base de céréales destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge		0.5
Céréales brutes autres que le blé dur, avoine et maïs	DON	1250
Blé dur brut et avoine brut		1750
Maïs brut		1750
Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit- déjeuner		500
Produits dérivés de céréales		750
Farine de maïs non mise sur le marché pour le consommateur final		1250
Aliments pour bébés et préparations à base de céréales destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge		200
Céréales brutes autres que le maïs	ZEN	100
Maïs brut		350
Produits dérivés de céréales		75
Pain, pâtisseries, biscuits, collations aux céréales et céréales pour petit-déjeuner		50
Maïs mis sur le marché pour le consommateur final, collations à base de maïs et céréales pour petit-déjeuner à base de maïs		100
Farine de maïs non mise sur le marché pour le consommateur final		300
Autres produits de mouture du maïs non mis sur le marché pour le consommateur final		200
Aliments pour bébés et préparations à base de céréales destinés aux nourrissons et enfants en bas âge		20
Maïs brut	FUMB1+FUMB2	4000
Produits dérivés de mais		1000
Céréales pour petit-déjeuner à base de maïs et collations à base de maïs		800

Produits	Mycotoxines	Teneur maximale réglementaire (µg/kg)
Farine de maïs non mise sur le marché pour le consommateur final	FUMB1+FUMB2	2000
Autres produits de mouture du maïs non mis sur le marché pour le consommateur final		1400
Alimentation à base de maïs pour nourrissons		200

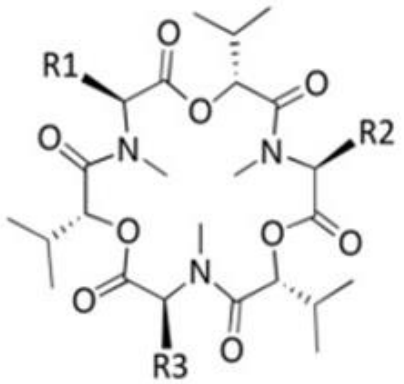
I.5. Les mycotoxines émergentes

Certaines espèces du genre *Fusarium* produisent des mycotoxines dites émergentes. Ce sont les ENs, la BEA, la MON et la FUS (Jestoi et al., 2008). La structure chimique de la BEA et des ENs est similaire. Il s'agit d'hexadepsipeptides cycliques qui diffèrent par des résidus aminés (R1, R2 et R3) : N-méthyl-phénylalanines pour la BEA, N-méthyl-valine et N-méthyl-isoleucine pour les ENs (Figure 1). Ces mycotoxines ne sont soumises à aucune réglementation ou recommandation, bien qu'elles soient activement surveillées par l'EFSA (Gautier, Pinson-Gadais, and Richard-Forget 2020).

Au cours de la dernière décennie, il y a eu une augmentation de la production des mycotoxines émergentes dans les céréales et produits dérivés des céréales à l'échelle mondiale. Les ENs sont produites principalement par trois espèces de *Fusarium* : *F. avenaceum, F. tricinctum* et *F. acuminatum* (Jestoi et al., 2008). A ce jour, 29 enniatines ont été décrites, les ENs A, A1, B et B1 étant les plus largement répandues dans les céréales. L'ENB sont hépatotoxiques (Svingen et al., 2017), génotoxiques avec altération de l'ADN au niveau du foie et de la moelle épinière (Maranghi et al., 2018) et immunotoxiques (Ficheux, Sibiril, and Parent-Massin 2013; Gammelsrud et al., 2012).

Les ENs coexistent souvent avec d'autres mycotoxines dans le même substrat (Prosperini et al., 2017). Plusieurs études ont lié leur toxicité aux propriétés inophoriques, car elles sont capables de moduler les effets toxiques d'autres mycotoxines. En fonction des concentrations en ENs, des interactions entre mycotoxines sont possibles telles que les effets additifs, antagonistes et synergiques (Fernández-Blanco, Font, and Ruiz 2016; Prosperini, Font, and Ruiz 2014). A l'heure actuelle, il n'y a pas de limite légale pour les ENs dans les aliments.

A



B

	R1	R2	R3
Enniatin A	*sec*-butyl	*sec*-butyl	*sec*-butyl
Enniatin A1	*iso*-propyl	*sec*-butyl	*sec*-butyl
Enniatin B	*iso*-propyl	*iso*-propyl	*iso*-propyl
Enniatin B1	*iso*-propyl	*iso*-propyl	*sec*-butyl

C

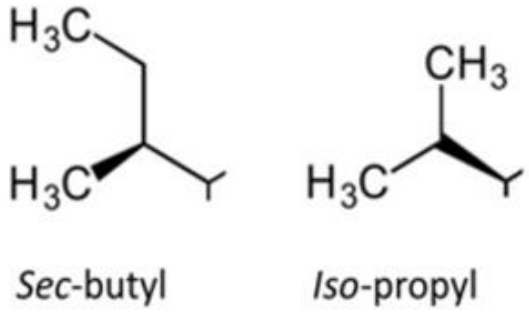


Figure 1: Structure des enniatines. (A) Structure cyclohexadepsipeptidique générale, (B) Nature chimique des groupements R1, R2 et R3, (C) Structures chimiques des groupements de sec-butyl et iso-propyl (Olleik et al., 2019).

I.6. Les facteurs influençant la mycotoxinogenèse

La présence de moisissures toxinogènes dans un aliment ne signifie pas nécessairement une contamination par les mycotoxines, et la disparition des moisissures ne garantit pas l'absence de mycotoxines, ces dernières pouvant persister en raison de leur stabilité. La contamination fongique des plantes et la synthèse des mycotoxinogenèse dépendent de plusieurs facteurs physiques (activité de l'eau, température…), chimiques (pH, concentration en O_2, nature du substrat…), biologiques (présence d'insectes, interactions microbiennes…) ainsi que technologiques (pratiques culturales et post-récolte) (Daou et al., 2021; Ramesh et al., 2003).

L'activité de l'eau (a_w) est définie comme le rapport de la pression de vapeur d'eau d'un produit (p) sur la pression de vapeur de l'eau pure (p0), à une température donnée (Bellí et al., 2004). C'est la quantité d'eau « libre » nécessaire aux réactions biochimiques d'un microorganisme. L'a_w varie de 0 (pour les substrats où toute l'eau est retenue) à 1 (pour les substrats où l'eau est disponible).

Pour la majorité des espèces fongiques, la valeur optimale d' a_w pour leur croissances se situe entre 0,85 et 0,99. Certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* peuvent se développer à des a_w proches de 0,75 et pour une température de 25°C (Bellí et al., 2004). Elles font partie des espèces xérophiles rencontrées dans les produits à faible teneur en eau (céréales, fruits secs…), en particulier lorsqu'ils sont stockés. Au contraire, les espèces de *Fusarium* nécessitent une a_w supérieur à 0,9.

La croissance des moisissures et la production des mycotoxines sont influencées par la température. La température optimale pour la croissance fongique est généralement plus élevée que celle pour la toxinogenèse. Par exemple, *Penicillium viridicatum* se développe à des températures de 0 à 31°C et une a_w de 0,95, tandis que l'OTA ne peut être synthétisée qu'à des températures allant de 12 à 24°C (Creppy 2002). Les champignons, généralement mésophiles se développent entre 20 et 25°C. Les espèces mésophiles ne germent pas en dessous de 5°C, mais peuvent survivre pendant de longues périodes, en particulier dans le cas de plusieurs espèces d'*Aspergillus*.

Le pH est également un facteur majeur dans la croissance des moisissures et la production des mycotoxines (Jouany 2007). Les moisissures peuvent se développer dans une plage de pH allant de 3 à 8, avec une croissance optimale entre 5 et 6. Comme pour la température et l'a_w, l'intervalle de pH qui permet une croissance fongique optimale est plus large que celui de la synthèse des toxines.

La nature du substrat joue un rôle important dans le processus de développement des champignons. Les plantes riches en glucides et en cellulose, tels que les céréales et les ensilages, sont les meilleurs substrats pour la croissance des moisissures toxinogènes (Figure 2).

Les ravageurs, en particulier les insectes, sont des vecteurs des spores fongiques et provoquent des blessures qui favorisent l'entrée des spores dans les denrées agricoles comme les grains (Murphy et al., 2006).

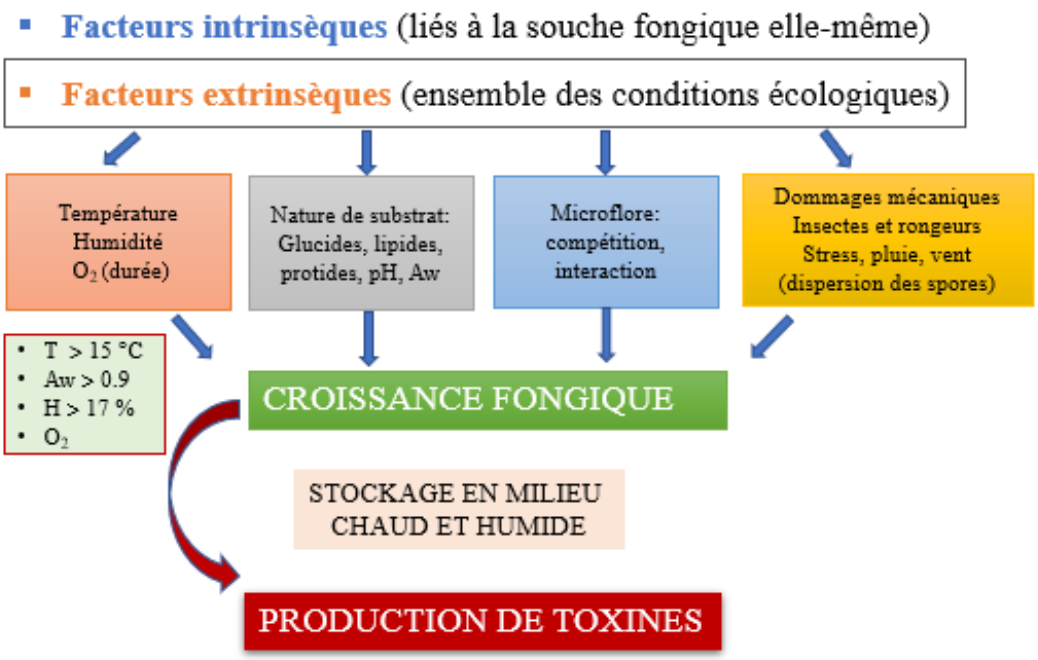


Figure 2: Les facteurs influençant la croissance des champignons et la production des mycotoxines.

I.7. La prévalence des mycotoxines

I.7.1. Dans le monde

Les mycotoxines sont des contaminants naturels d'une vaste gamme de produits alimentaires. Elles contaminent les céréales et les produits dérivés (Andrade et al., 2017; Rodríguez-Carrasco et al., 2013), les produits d'origine végétale tels que les fruits, les légumineuses, les oléagineux, les raisins secs, les épices, le café et le cacao, les jus et les produits fermentés. Elles contaminent aussi les produits d'origine animale : le lait, les viandes et les abats (Bavaro et al., 2017; Burlakoti et al., 2008; Ntasiou et al., 2015; Ostry et al., 2018; Wu, Xie, and Xu 2018). Selon la FAO, la contamination par les mycotoxines affecte 25% des produits agricoles dans le monde entier, entrainant des pertes économiques importantes.

I.7.2. En Afrique du nord

L'Afrique du Nord (Algérie, Égypte, Libye, Maroc et Tunisie) se caractérise par un climat chaud et humide. Ces facteurs favorisent la croissance des champignons toxinogènes et, par conséquent, la production de mycotoxines qui peuvent contaminer les céréales au champ, lors de la récolte et durant le stockage.

Le secteur des céréales occupe une place importante dans l'agriculture et la transformation industrielle. L'exposition humaine aux mycotoxines est très élevée en raison de la forte consommation de cultures contaminées (blé, orge et riz) dans l'alimentation quotidienne

et de produits dérivés d'animaux nourris d'aliments contaminés. Par ailleurs, plusieurs auteurs ont signalé la présence de mycotoxines (AFs, l'OTA, le DON, la ZEN, les FUM, les toxines T2 et HT-2, les ENs et la NIV) dans les céréales et leurs dérivés (Tableau 3).

Tableau 3: Occurrence des mycotoxines dans les céréales et produits dérivés des pays d''Afrique du Nord (Algérie, Egypte et Maroc).

Pays	Produits destinés à l'alimentation humaine ou animale	Mycotoxines	Fréquence (%) (nombre d'échantillons positifs / échantillons totaux)	Concentration min-max (moyenne) (µg/kg pour toutes les mycotoxines)	Références bibliographiques
Algérie	Blé	OTA AFB1 OTA	40 (12/30) 56.60 (30/53) 69.23 (27/39)	0.21-41.55 0.13-37,42 0.21-27.31 (7.09)	(Riba et al., 2010) (Riba et al., 2010) (Zebiri et al., 2019)
	Blé de semoule Farine de blé	OTA OTA	75.86 (22/29) 100 (13/13	0.16-34.75 0.36-18.18	(Zebiri et al., 2019) (Zebiri et al., 2019)
Egypte	Blé	ZEN AFB1 OTA	40 (6/15) 33.33 (12/36) 5.55 (2/36)	0.53-2.5 (1.55) 0.05-49.79 <LOQ-1.37	(El-Desouky and Naguib 2013) (Hathout et al., 2020) (Hathout et al., 2020)
	Orge	ZEN	26.66 (4/15)	0.7-1.77 (1.25)	(El-Desouky and Naguib 2013)
	Maïs	AFB1 AFB2 AFs FB1 FB2 ZEN	24.59 (15/61) 9.83 (6/61) - - - 33.33 (10/30)	0.20-44.9 (8.7) 0.10-7.0 (2.2) 0.23-19.4 LOQ-947 LOQ-310 1.13-3.7	(Abdallah et al., 2019) (Abdallah et al., 2019) (Madbouly et al., 2012) (Madbouly et al., 2012) (Madbouly et al., 2012) (El-Desouky and Naguib 2013)
	Riz	AFs FB1 FB2	- - -	0.04-21.68 LOQ-3200 LOQ-171.4	(Madbouly et al., 2012)
Maroc	Farine de blé	OTA DON AFB1	11.76 (2/17) 41.17 (7/17) 17.64 (3/17)	LOQ-30.6 (29.4) LOQ-128 (65.9) 0.03-0.15	(Hajjaji et al., 2006) (Hajjaji et al., 2006) (Zinedine et al., 2017)
	Blé de semoule	DON	7.14 (6/84)	21.1-305.7 (6.4)	(Zinedine et al., 2017)
	Couscous	ZEN NIV ENA ENA1 ENB ENB1	34.52 (29/84) 15.47 (13/84) 42.85 (36/84) 69 (58/84) 96.42 (81/84) 96.42 (81/84)	22.0-132.1 (33.4) 52.4-462.2 (37.9) 2.6-651.7 (17.5) 0.8-191.2 (26.4) 3.0-592.0 (52.5) 0.7-535.7 (23.9)	(Zinedine et al., 2017)
	Farine de maïs	AFB1	80(16/20)	0.23-11.2	(Zinedine et al., 2017)
	Riz	OTA	26 (26/100)	0.08-47	(Juan et al., 2008)
	Pâte	ZEN DON HT-2 T2	51.88 (55/106) 40.56 (43/106) 34.90 (37/106) 16 (17/106)	0.5-3 16-900 7-419 4-50	(Bouafifssa et al., 2018)

I.7.3. La Tunisie

La Tunisie, en raison de son climat chaud et humide, constituent un foyer favorable à la prolifération des champignons toxinogènes et la production des mycotoxines. En effet, plusieurs mycotoxines détectées dans les céréales indiquaient des niveaux de contamination supérieurs aux limites fixées par la règlementation européenne. Plusieurs auteurs ont signalé la présence de mycotoxines (AFs, l'OTA, le DON, la ZEN, les FUM, les toxines T2 et HT-2 et les ENs) dans les céréales telles que le blé, l'orge, le sorgho, le maïs, le riz ainsi que leurs dérivés (Tableau 4).

Tableau 4: Occurrence des mycotoxines dans les céréales et produits dérivés consommés en Tunisie.

Produits destinés à l'alimentation humaine et animale	**Mycotoxines**	**Fréquence % (nombre des échantillons positifs / échantillons totaux)**	**Concentration min-max (moyenne) µg/kg (pour tous les mycotoxines)**	**Références**
Blé	AFs	8.33 (2/24)	0.6-0.8	(Ghali et al., 2010)
	AFG2	11.76 (4/34)	5.2-8.7 (6.6)	(Oueslati et al., 2012)
	HT2	11.76 (4/34)	5.35-7.1 (5.8)	(Oueslati et al., 2012)
	FB2	2.94 (1/34)	8.7	(Oueslati et al., 2012)
	AFs	29.41 (15/51)	4-12.9 (6.7)	(Ghali et al., 2008)
	AFB1	7.84 (4/51)	1.1-3.4 (2.2)	(Ghali et al., 2008)
	OTA	60.2	0.7-24.3 (2.9)	(Ghali et al., 2008)
	ZEN	1.96 (1/51)	LOQ-2.8 (2.82)	(Ghali et al., 2008)
	CIT	50 (100/200)	0.1-170 (28)	(Zaied et al., 2012a)
	ZEN	75(153/205)	3-560 (60)	(Zaied et al., 2012b)
	OTA	7.69 (1/13)	3.30	(Jedidi et al., 2017)
	FUM	20.83 (5/24)	95-421	(Jedidi et al., 2021)
	ZEN	8.33 (2/24)	21.5-32.4	(Jedidi et al., 2021)
	DON	12.5 (3/24)	12.2-212.3	(Jedidi et al., 2021)
	NIV	4.16 (1/24)	9.2	(Jedidi et al., 2021)
	T2 +HT2	4.16 (1/24)	11.1	(Jedidi et al., 2021)
	DON	83.07 (54/65)	7.2-54	(Bensassi et al., 2010)
Produit à base be blé (pain et biscuits)	DON	88.69 (102/115)	1.7-54 (14)	(Oueslati et al., 2020)
	ZEN	1.73 (2/115)	9.5-15 (0.21)	
	ENB	100 (115/115)	0.05-10.7 (1.7)	
	ENB1	16.52 (19/115)	0.4-5.4 (0.7)	
Orge	AFs	8.69 (4/46)	0.15-18.6	(Ghali et al., 2010)
	AFG2	80 (4/5)	23.1-52.4 (35.5)	(Oueslati et al., 2012)
	HT-2	60 (3/5)	4.97-11.1(7.9)	(Oueslati et al., 2012)
	FB1	20 (1/5)	63.1	(Oueslati et al., 2012)
	AFs	44 (11/25)	3.5-11.5 (7)	(Ghali et al., 2008)
	AFB1	12 (3/25)	1.6-50(18.4)	(Ghali et al., 2008)
	OTA	52 (12/25)	0.6-3.4(1.9)	(Ghali et al., 2008)
	ZEN	8 (2/25)	9.7-21.5(15)	(Ghali et al., 2008)
	AFs	73.46 (36/49)	0.4-25.8	(Ghali et al., 2010)
	AFB1	66.66 (2/3)	14.4-79.9 (46.7)	(Oueslati et al., 2012)
	AFG2	100 (3/3)	13-36.8 (24.6)	(Oueslati et al., 2012)
	FB1	66.66 (2/3)	6.4-120 (120)	(Oueslati et al., 2012)
	FUM	40 (8/20)	43-7455	(Jedidi et al., 2021)
	ZEN	5 (1/20)	21.2	(Jedidi et al., 2021)
	DON	20 (4/20)	5.4-105.4	(Jedidi et al., 2021)

Produits destinés à l'alimentation humaine et animale	Mycotoxines	Fréquence % (nombre des échantillons positifs / échantillons totaux)	Concentration min-max (moyenne) µg/kg (pour tous les mycotoxines)	Références
Orge	NIV	5 (1/20)	12.4	(Jedidi et al., 2021)
	T2+HT2	10 (2/20)	14.3-14.6	(Jedidi et al., 2021)
	BEA	10	74.3-75 (8)	(Juan et al., 2017)
	DON	23	1.7-6.1 (0.8)	(Juan et al., 2017)
	NIV	10	15.8- 110.7 (7.5)	(Juan et al., 2017)
	HT2	6	52.7-140 (6.4)	(Juan et al., 2017)
	OTA	6	3-2.9 (0.6)	(Juan et al., 2017)
	FB1	3	42 (1.3)	(Juan et al., 2017)
	ENA	16	31.6-287 (19.3)	(Juan et al., 2017)
	ENA1	10	40.5-220.3 (10.9)	(Juan et al., 2017)
	ENB	10	107.3-184.6 (18.5)	(Juan et al., 2017)
	ENB1	10	112.4-162.7 (14.7)	(Juan et al., 2017)
Sorgho	FB2	33.33 (1/3)	61.5	(Oueslati et al., 2012)
	AFB1	59.45 (22/37)	0.03-9.48 (1.24)	(Lahouar et al., 2018)
	OTA	35.13 (13/37)	1.04-27.8 (1.71)	(Lahouar et al., 2018)
	ZEN	35.13 (13/37)	3.75-64.52 (7.74)	(Lahouar et al., 2018)
	AFs	76.47 (13/17)	1.7-67 (22.3)	(Ghali et al., 2008)
	AFB1	58.82 (10/17)	1.5-41.4 (11.6)	(Ghali et al., 2008)
	OTA	52.94 (9/17)	2.5-36.4 (14.4)	(Ghali et al., 2008)
	ZEN	23.52 (4/17)	7.3-14 (10.9)	(Ghali et al., 2008)
Maïs	AFs	5.88 (1/17)	0.42	(Ghali et al., 2010)
	AFs	42.8	2.9-12.5 (7.6)	(Ghali et al., 2008)
	AFB1	4.2	1.4-4.8 (3.1)	(Ghali et al., 2008)
	OTA	1.9	0.92-6.7 (3.3)	(Ghali et al., 2008)
	FUM	57.14 (12/21)	30224-123	(Jedidi et al., 2021)
Maïs (post-récolte)	AFs	81.81 (9/11)	1.13-99.32 (11.08)	(Jedidi et al. 2017)
Maïs (à la récolte)	AFs	90 (9/10)	1.0-969.18 (111.47)	
Riz	ZEN	9	1.9-11.4(5.4)	(Ghali et al., 2008)
	AFs	12.50 (2/16)	2-7.5(4.7)	
	OTA	25 (4/16)	0.8-2.3(1.4)	

I.8. Les aflatoxines

I.8.1. Définition et propriétés chimiques

Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement apparentés, dont quatre sont les plus répandues dans les aliments (B1, B2, G1, G2) et M1 dans le lait. Elles sont produites par des champignons du genre *Aspergillus* (Bhatnagar-Mathur et al., 2015).

Toutes les aflatoxines possèdent une structure moléculaire similaire à l'une de ces deux structures (AFB, AFG), et la seule différence entre elles est la position des différents radicaux sur le noyau (Khoury 2007). Ce sont des cristaux incolores ou des cristaux jaune pâle, fluorescent sous la lumière ultraviolette. Les molécules AFB1 ($C_{17}H_{12}O_6$, 312 g/mol) et AFB2 ($C_{17}H_{14}O_6$, 314 g/mol) émettent une fluorescence bleue, tandis que les molécules AFG1 ($C_{17}H_{12}O_7$, 328 g/mol) et AFG2 ($C_{17}H_{14}O_7$, 330 g/mol) émettent une fluorescence vert

jaune. L'AFM1 ($C_{17}H_{12}O_7$) a une masse molaire de 328 g/mol et émet une fluorescence bleu-violet (Hinton et al., 2003; Richard et al., 2003).

Les aflatoxines sont de petites molécules de faible poids moléculaire qui sont très solubles dans l'eau, insolubles dans des solvants non polaires et très solubles dans des solvants organiques modérément polaires comme le chloroforme et le méthanol (AFSSA, 2006; Khoury, 2007).

I.8.2. Toxicocinétique et propriétés toxicologiques

❖ Toxicocinétique :

Les aflatoxines sont absorbées par le tractus gastro-intestinal, métabolisées, distribuées dans tout le corps et excrétées par diverses voies après avoir consommer des aliments contaminés (Niderkorn et al., 2006). Les enzymes du cytochrome P450 monooxygénases (CYPs P450) participent à la première phase de la biotransformation de l'aflatoxine, formant l'AFM1 par hydroxylation, l'AFB1 8,9-époxyde par époxydation et l'aflatoxicol par réduction ou hydrolyse (AFSSA, 2009),). La quantité de métabolites formés et de cytochromes impliqués est déterminé par l'espèce animale et les tissus. La conjugaison de l'AFB1 8,9-époxyde au glutathion par le glutathion S-transférases se produit dans une deuxième phase. La principale voie de détoxification de l'aflatoxine est largement considérée comme la conjugaison au glutathion (Galtier et al., 2006 ; AFSSA, 2009).

❖ Propriétés toxicologiques :

La consommation d'un régime alimentaire contaminé par les AFs peut induire une toxicité aigüe et une toxicité chronique à long terme non seulement chez les animaux, mais également chez l'homme. Les AFs sont génotoxiques, cytotoxiques et cancérogènes et leurs niveaux individuels ou combinés sont réglementés dans plusieurs pays (Ahlberg et al., 2018 ; Commission européenne, 2023).

- Pouvoir cancérogène

Le foie est le principal organe cible des AFs. Les AFs sont l'un des facteurs étiologiques majeurs dans le développement du carcinome hépatocellulaire (IARC, 2002). En effet, la consommation à long terme d'aliments contaminés par les AFs entraîne des effets néfastes sur le foie, tels que des lésions des cellules et des tissus hépatiques, ainsi que des anomalies aigue (J. G. Williams et al., 2011; Gholami-Ahangaran et al., 2016). L'OMS a estimé de 25 000 à 155 000 cas de cancer du foie causés annuellement par des AFs dans le monde entier (Unicef 2008) dont 40 % en Afrique (Liu and Wu, 2010).

La formation d'adduits AFB1-ADN est considérée comme une étape clé dans l'initiation de l'hépatocarcinogenèse induite par l'AFB1 (Preston & Williams, 2005; Mosaad A Abdel-Wahhab et al., 2006). Dans ce contexte, le CIRC les a classés dans le groupe 1 "Produit cancérogène pour l'homme" (IARC, 1987). Ainsi, la présence des doubles liaisons C=C à l'extrémité de leurs groupements furanes joue souvent un rôle important dans des propriétés toxiques et cancérigènes, permet l'ajout d'O2 et favorise la formation d'un cycle époxyde triangulaire très toxique (Tabuc, 2007).

L'AFB1 est métabolisée par le cytochrome hépatique P450 pour produire l'AFB1-8, 9-époxyde, un intermédiaire hautement réactif, qui est ensuite lié à des sites nucléotidiques de l'ADN (Sharma and Farmer 2004). L'interaction avec les acides nucléiques (ADN) et l'intervention dans la synthèse des protéines (traduction, blocage de l'ARNr, de l'ARNt et de l'ARNm) sont les principaux modes d'action toxiques de cet époxyde, entraînant une génotoxicité et une mutagénicité. L'interaction de l'AFB1 8, 9-époxyde avec les protéines, en particulier les résidus de lysine portant une séquence de translocation nucléaire (NLS), semble aggraver les effets toxiques de la molécule en favorisant le transport près de l'ADN (AFSSA, 2006; Pierre Galtier et al., 2006).

- Immunotoxicité

Les effets immunomodulateurs et immunotoxiques des AFs chez diverses espèces animales ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*. Elles ont un impact sur les réponses inflammatoires et inhibent plusieurs fonctions des macrophages (la phagocytose), la production d'espèces réactives d'oxygène, ainsi que la chimiotactisme de neutrophile et l'activité des cellules NK « Natural Killers » (Bondy and Pestka 2000). Les AFs provoquent l'atrophie des organes lymphoïdes, réduisent l'hypersensibilité retardée aux agents mitogènes, altèrent la prolifération lymphocytaire et modifient la production de cytokines (Otim et al., 2005).

- Stress oxydant et mort cellulaire

L'exposition aux AFs provoque un stress oxydatif en augmentant la peroxydation lipidique et en diminuant l'activité des enzymes antioxydantes et l'expression de leurs gènes chez les rats. Elle génère des EROS intracellulaires comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène (Abdel-Wahhab and Aly, 2003, 2005; Choi et al., 2010; Kanbur et al., 2011). En effet le stress oxydatif est un facteur primordial dans l'induction de l'apoptose (Meki et al., 2004).

- Insuffisance glomérulaire

L'ingestion des AFs entraîne une diminution significative de l'apport alimentaire et du poids corporel. Cela est dû à une diminution significative de la leptine, qui agit ainsi que ses récepteurs en tant qu'acteurs de la régulation de l'équilibre énergétique et du contrôle du poids corporel (Yuan et al., 2004; Abdel-Wahhab et al., 2006). La réduction de l'apport alimentaire peut indiquer un catabolisme des protéines, contribuant ainsi à une lésion rénale entraînant une insuffisance de la filtration glomérulaire (Tessari et al., 2006).

I.8.3. Les aflatoxines B1 et M1

L'AFB1 est l'aflatoxine la plus toxique et la plus fréquente dans de nombreux produits alimentaires et l'un des mutagènes et cancérigènes naturels les plus puissants (IARC, 1993). Après absorption, les formes circulantes de l'AFB1 sont principalement associées aux protéines plasmatiques, retardant la filtration glomérulaire et donc l'élimination rénale (Wong and Hsieh 1978). Elle se trouve principalement dans les organes métaboliques et les organes d'épuration (foie et reins), mais des traces peuvent aussi être trouvées dans d'autres tissus comme le cœur, les poumons, le cerveau et les muscles (Stubblefield et al., 1983).

L'AFB1 est principalement biotransformée dans le foie et les muqueuses gastro-intestinales. En effet, une partie de l'AFB1 est éliminée après biotransformation dans la bile conjuguée au glutathion ou au sulfate. Chez la plupart des espèces animales, la sécrétion biliaire représente 50% de la dose excrétée. 15 à 25% de la dose ingérée est excrétée dans l'urine sous forme inchangée, dérivés conjugués, adduits à l'ADN ou sous formes métabolisées telle que l'AFM1 (Pfohl-Leszkowicz 1999). L'AFB1 présente une toxicité aiguë ou chronique, notamment hépatotoxique, mutagène, immunomodulateur et tératogène chez divers organismes (Polychronaki et al., 2007; Abdel-Wahhab et al., 2010; Rocha et al., 2014; El-nekeety et al., 2018). Par conséquence, l'AFB1 est l'un des cancérogènes naturels les plus puissants (AFSSA 2009). Elle a la capacité d'activer les proto-oncogènes RAS tout en inactivant également le gène suppresseur de tumeur p53 par mutation génétique (Galtier et al., 2006).

Les résidus de mycotoxines dans les produits laitiers ont reçu peu d'attention parmi les contaminants trouvés dans les aliments humains. Les mycotoxines ont des propriétés différentes et donc des taux de lactation différents en raison de leurs différents modes de synthèse. Seuls les composés partiellement liposolubles qui résistent à l'hydrolyse du réseau ruminal présentent ce phénomène. Elles seront excrétées dans leur état naturel ou après biotransformation, comme l'AFB1, qui est excrété sous forme d'AFM1, le principal contaminant du lait (Fink-Gremmels 2008).

L'AFM1 est un dérivé monohydroxylé de l'AFB1. Elle se trouve fréquemment dans le lait et d'autres produits laitiers, ainsi que dans le foie, le rein et les muscles. La présence d'AFM1 dans le rumen est due au cycle entéro-hépatique (Pfohl-Leszkowicz 1999). L'AFM1 est largement présent comme contaminants alimentaires et son rapidité de présence dans le sang suggère qu'il est absorbés dans la partie supérieure de tube gastro-intestinal (Gratz et al., 2007) et leur élimination par les glandes mammaires des ruminants représente jusqu'à 0,1-2 % de la dose ingérés (Fink-Gremmels 2008). Les effets des traitements technologiques (pasteurisation, stérilisation, écrémage, séchage) et les traitements chimiques du lait contaminé par l'AFM1 ont été étudiés, mais elles ne sont pas efficaces pour l'éliminée (Barbiroli et al., 2007; Aly, 2019).

L'AFM1 est l'un des facteurs contribuant à un ralentissement de la croissance et/ou à l'apparition précoce d'un carcinome hépatocellulaire. Elle présente des effets cancérigènes, immunotoxiques et altèrent également le fonctionnement des organes de reproduction (AFSSA, 2006). Plusieurs recherches ont montré le potentiel toxique de l'AFM1 sur le foie, les reins, le système immunitaire et la rate soit *in vivo* (Abdel-wahhab, 2016; El-Nekeety et al., 2017; Ge et al., 2017; Vipin et al., 2017) ou *in vitro* (Abbès et al., 2006; Ben Salah-Abbes et al., 2015; Hamid et al., 2013).

I.9. La zéaralénone

I.9.1. Définition et propriétés chimiques

La ZEN ($C_{18}H_{22}O_{5)}$ est une lactone désaturée avec une masse molaire de 318 g/mol et une fonction cétone de l'acide résorcylique. Elle a été isolée pour la première fois sur du maïs contaminé par Gibberella ZEA (Stob et al., 1962). Elle est produite par plusieurs espèces de *Fusarium* telles que *F. culmorum* et *F. graminearum*. Elle contamine fréquemment les céréales au champ tels que le maïs, le blé, l'orge, l'avoine et d'autre produits végétaux et parfois lors du stockage (Rudolf et al., 2003). Elle a une très faible solubilité dans l'eau et dans les solvants apolaires comme l'hexane. La ZEN est soluble dans les solvants de polarité intermédiaire, ce qui lui permet une large distribution dans tout le corps (Gaumy, Bailly, and Guerre 2001).

I.9.2. Toxicocinétique et propriétés toxicologiques

❖ Toxicocinétique :

Plusieurs études pharmacocinétique et métabolique ont révélé que la ZEN est rapidement absorbée après administration par voie orale (Avantaggiato et al., 2003; Zinedine et al., 2007b). Elle est métabolisée par le foie, ainsi que par la muqueuse intestinale et elle est excrétée dans l'urine et dans les fèces. Dès l'ingestion, la ZEN peut subir deux voies de

biotransformation. Elle se réduit, par les enzymes 3-α et 3-β hydroxystéroïde déshydrogénases (HSDs), en α-zéaralénole et en β-zéaralénole dont la toxicité est beaucoup plus forte que celle de la toxine mère (Dong et al., 2010). La ZEN et ses métabolites peuvent se conjuguer avec l'acide glucuronique (Pfeiffer et al., 2010). Ces métabolites sont connus pour leur effet oestrogénique chez les animaux (Hussein and Brasel 2001). Plusieurs études *in vitro* ont montré que la ZEN et ses dérivés sont facilement glucurono-conjugués dans le foie, l'intestin et les organes extra-hépatiques des humains et de diverses espèces animales (rats, porcs, bovins) (Pfeiffer et al., 2010). Chez le rat et la souris, l'excrétion biliaire avec une circulation entérohépatique se produit, tandis que l'excrétion urinaire prédomine chez le lapin. En raison d'une faible réabsorption dans les viscères, l'excrétion urinaire est la majeur voie d'élimination chez les porcs.

- Mécanisme d'action :

La ZEN est une mycotoxine oestrogénique non-stéroïdienne qui peut prendre une conformation très semblable au 17 β -estradiol (une hormone féminine produite par les ovaires) et lui faire concurrence pour se lier aux récepteurs oestrogéniques. La ZEN et ses dérivés peuvent se lier de manière compétitive aux récepteurs cytosoliques oestrogéniques (ESR1 et ESR2) dans les tissus cibles tels que l'utérus, l'hypothalamus, le foie et les glandes mammaires et pituitaires (Takemura et al., 2007; Zinedine et al., 2007). La fixation aux récepteurs n'entraîne pas toujours une réponse oestrogénique. Chez des souris en gestation, par exemple, il est découvert qu'une dose 100 fois plus élevée de ZEN était nécessaire pour obtenir le même effet sur le développement des glandes mammaires que le 17 β-œstradiol (Hilakivi-Clarke et al., 1998). La potentialité œstrogènique des deux molécules est très différent après l'administration orale, la ZEN étant 650 fois moins efficace que le 17 β-œstradiol (Everett et al., 1987).

La ZEN peut interférer indirectement avec le métabolisme d'un large éventail de molécules endogènes et xénobiotiques (Ding, Lichti, and Staudinger 2006). De nombreuses études ont montré que la ZEN peut activer le PXR (Pregnane X Receptor, un récepteur nucléaire) (Fink-Gremmels and Malekinejad 2007; Mnif et al., 2007). Or, le PXR régule l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des molécules endogènes et xénobiotiques, tels que CYP3A4, glutathion-S-transférases, sulfotransférases et les UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) (Ding et al., 2006).

- Propriétés toxicologiques :

Le devenir de la ZEN dans le corps se distingue par une hétérogénéité interspécifique importante dans son métabolisme et son stockage dans les organes cibles. L'administration régulière de la ZEN, ainsi que son accumulation dans l'organisme, peuvent engendrer des conséquences nocives. La ZEN a été classée dans le groupe 3 par le CIRC (composé potentiellement cancérogène) (EFSA 2014). Le système reproducteur est la principale cible de la toxicité de la ZEN. Elle est susceptible de causer des problèmes de reproduction graves chez les animaux. Les effets les plus significatifs résultent de l'interaction directe avec les récepteurs cytosoliques aux œstrogènes et de l'interférence avec l'équilibre des stéroïdes actifs dans les tissus riches en récepteurs stéroïdes. Elle cause des perturbations du cycle sexuel et des modifications morphologiques et physiologiques des gonades causant ainsi la diminution de la fertilité (Long et al., 2016; Pang et al., 2017; Yang et al., 2016). Des signes d'hyperoestrogénisme, comme un gonflement et un épaississement vaginal et vulvaire, ont également été observés quelques jours après le début de l'exposition à la ZEN (Obremski et al., 2003). Cette dernière entraîne aussi une augmentation de la résorption foeto-embryonnaire, une diminution de la taille des portées, des changements dans la glande surrénale, la thyroïde et le poids de l'hypophyse et des changements dans les taux sériques de progestérone et des œstrogènes (Gao et al., 2017; Zhang et al., 2018). De même, La ZEN est responsable de certaines anomalies du système reproducteur masculin, mais de façon beaucoup moins importante par rapport au système reproducteur féminin (EFSA 2014). On peut citer des anomalies de la sécrétion hormonale (testostérone, hormone gonadotrophique…) et une diminution du nombre des spermatozoïdes (Long et al., 2016, 2017; Pang et al., 2017). Elle est également responsable de l'atrophie testiculaire et des anomalies histologiques (Kim et al., 2003).

In vitro, la ZEN et ses métabolites perturbent le cycle cellulaire et induisent la fragmentation d'ADN (Abid-Essefi et al., 2003). Elles inhibent la synthèse des protéines et de l'ADN et augmente le niveau d'un indicateur du stress oxydatif ; le malondialdéhyde (MDA) (Abid-Essefi et al., 2004).

En outre, la ZEN est principalement métabolisée par le foie, elle entraine des effets hépatotoxiques chez les rats et les souris (Maaroufi et al., 1996; Ben Salah-Abbès et al., 2009). De plus, des effets hématotoxiques, immunotoxiques et génotoxiques ont été observés après l'exposition à la ZEN (Zinedine et al., 2007).

I.10. L'ochratoxine A

I.10.1. Définition et propriétés chimiques

L'OTA a été isolée à partir d'*Aspergillus ochraceus* en 1965 dans le cadre d'un dépistage des moisissures productrices de toxines. Elle a été découverte dans un échantillon de maïs aux États-Unis en 1969 (Petzinger and Weidenbach 2002). *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum* sont les principaux producteurs d'OTA, mais aussi *A. sulphureus, A. ostanius* et *A. sclerotiorum* (Khoury et al., 2010).

L'OTA est un dérivé de l'acide aminé cyclique phénylalanine de formule brute $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Elle est un métabolite secondaire composé d'une liaison peptidique entre une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydrocoumarine et de L-phénylalanine. Il s'agit d'un solide blanc ayant une masse molaire de 403,8 g/mol (IARC, 1983). À pH acide ou neutre, elle est soluble dans des solvants organiques polaires et très peu soluble dans des solutions aqueuses. Elle est soluble et stable dans des solutions de bicarbonate de sodium et dans des solutions aqueuses alcalines.

I.10.2. Toxicocinétique et propriétés toxicologiques

❖ Toxicocinétique

En raison de ses propriétés acides (pKa = 7,1), l'OTA est d'abord absorbée dans l'estomac, mais elle peut aussi être absorbée dans l'œsophage. L'intestin grêle est le principal site d'absorption de l'OTA, principalement au niveau du jéjunum proximal (Madhyastha et al., 1992). Elle est hydrolysée par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine en OTα non toxique. Dans le foie, l'OTA est converti en métabolites mineurs tels que les 4R- et 4S-hydroxy-ochratoxine A (4-OH-OTA) et 10-hydroxy-ochratoxine A (10-OH-OTA). Vue que les isomères 4-OHOTA peuvent être trouvés dans le sang ou l'urine sous ces formes ou conjugués avec le glutathion, ils sont considérés comme des métabolites de détoxification partielle. Dans le sang, il y a très peu d'OTA sous forme libre (Yang et al., 2015; Zepnik, Völkel, and Dekant 2003). L'OTA a une affinité élevée pour certaines protéines plasmatiques, avec lesquelles elle est fixée à 90%. Cette fixation ralentit le transport de l'OTA vers divers organes, augmente sa demi-vie sérique et contribue ainsi au développement d'effets toxiques chroniques (Duarte, Lino, and Pena, 2012).

L'OTA a plusieurs voies d'élimination : urinaire, fécale et biliaire. 30 à 40% de l'OTA absorbée est principalement excrété dans l'urine sous forme inchangé ou d'OTα (AFSSA, 2009). La majorité des OTA hydroxylées sont éliminées par voie biliaire (AFSSA, 2009). L'OTA augmente la peroxydation des lipides, un processus par lequel les acides gras

polyinsaturés sont oxydés. En conséquence, l'OTA aurait un effet négatif sur les lipides qui composent les membranes phospholipidiques des cellules, provoquant des majeurs changements structurales (Marin-Kuan et al., 2011).

❖ Propriétés toxicologiques

La toxicité la plus connue de l'OTA est la toxicité rénale, c'est en fait un néphrotoxique très puissant. Elle inhibe les mécanismes de transport de l'anion dans les membranes cellulaires tubulaires en empêchant la production d'Adénosine TriPhosphate (ATP) mitochondrial (Stoev et al., 2010a ; 2010b)

La néphropathie endémique des Balkans (NEB), une affection caractérisée par une insuffisance rénale chronique et une tubulonéphrite interstitielle, peut être causée par l'OTA (Hmaissia Khlifa et al., 2012). L'OTA pourrait aussi être la cause de cancers reproducteurs et hépatiques masculins. À cause de son potentiel cancérogène chez les animaux, le Centre International de Recherche sur le Cancer classe l'OTA comme cancérogène possible pour l'homme (IARC, 1993).

L'OTA permet la destruction cellulaire des organes lymphoïdes tels que la rate et le thymus. Cet aspect immunotoxique est accompagné de lésions de la moelle osseuse, qui se manifeste par un changement dans les lignées des globules blancs ainsi que le nombre de cellules immunitaires (lymphopénie). La prolifération des lymphocytes T et B est inhibée par l'OTA, tout comme la production d'Interleukin 2 (IL2) qui stimule la réponse immunitaire (Al-Anati and Petzinger 2006).

Le mécanisme d'action génotoxique de l'OTA n'était pas bien élucidé et deux hypothèses étaient suggérées. La première est en faveur de l'augmentation des ROS par l'OTA ce qui provoque un stress oxydatif et des dommages à l'ADN. La deuxième suggère que l'OTA entraîne la formation des espèces électrophiles qui interagissent directement avec l'ADN, générant des adduits. En outre, les deux phénomènes peuvent être complémentaires. Des adduits à l'ADN ont été détectés dans les reins de plusieurs animaux traités par l'OTA (Pfohl-Leszkowicz et al., 2007 ; ally, 2012 ; Doi and Uetsuka, 2014).

L'OTA a un effet toxique sur le métabolisme des lipides, des protéines et des glucides. Elle augmente la peroxydation lipidique des phospholipidiques membranaires. Elle peut prévenir la glycolyse, la synthèse de l'insuline et la synthèse des protéines (el Khoury and Atoui 2010; Marin-Kuan et al., 2011).

II. Le tractus gastro-intestinal : la première cible des mycotoxines ingérées

Les tissus intestinaux sont les premiers à être exposés à une concentration très élevée de mycotoxines par rapport aux autres tissus (Hussar et al., 2016). Les mycotoxines sont capables de toucher plusieurs fonctions du tractus gastro-intestinal. De nombreuses recherches indiquent un effet direct et/ou indirect des mycotoxines sur la qualité, la digestibilité et/ou l'absorption des nutriments et la morphologie intestinale (Fisher et al., 2012; J L Richard et al., 2012). De plus, les mycotoxines affectent la modulation des transporteurs des nutriments, la perte de la fonction de barrière et l'activité des enzymes, leur absorption et leur transport (Bryden, 2012).

II.1. La structure et la fonction du tractus gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal (TGI) représente la plus grande interface entre le corps et l'environnement, il assure la sécrétion des sucs digestifs, l'absorption des nutriments et l'excrétion. Il est un écosystème complexe, constitué par l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et le gros intestin. Chaque partie du TGI a sa propre fonction, comme l'illustre la figure 3.

L'appareil digestif permet la digestion, au sens large, c'est l'ensemble des processus qui permettent l'ingestion des aliments, leur simplification, leurs dégradations en nutriments, leur absorption et leur passage dans le sang (ou la lymphe). Il y a 4 mécanismes fondamentaux de la fonction digestive : la digestion des aliments en molécules plus petites, l'absorption des nutriments depuis la lumière du tube vers le liquide extracellulaire, la motilité (capacité de mouvement permettant le déplacement des produits dans le tube digestif) et la sécrétion de substances par les cellules épithéliales dans la lumière du tube ou vers le liquide interstitiel (PÉRILLEUX et al., 2002) (Figure 4).

Le bol alimentaire est décomposé en chyme, qui est ensuite transporté dans l'intestin grêle par l'action des contractions de l'estomac. Il abrite une grande population bactérienne dite le microbiote intestinal. Ce dernier est principalement composé de bactéries anaérobies facultatives telles que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, ainsi que de bactéries anaérobies strictes comme les bifidobactéries, les bactéroïdes et les clostridies.

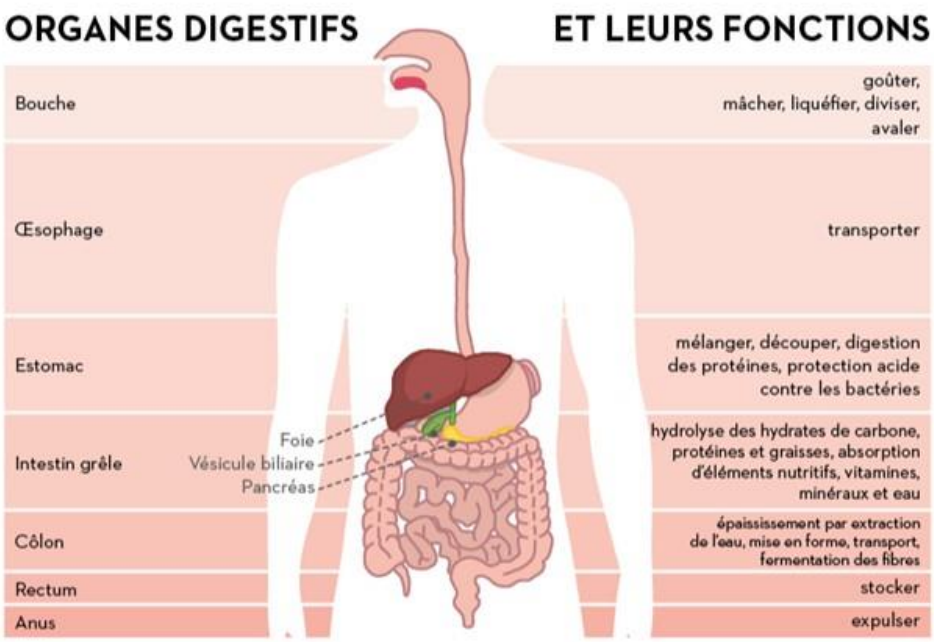


Figure 3: Vue d'ensemble de l'appareil digestif et de la digestion.

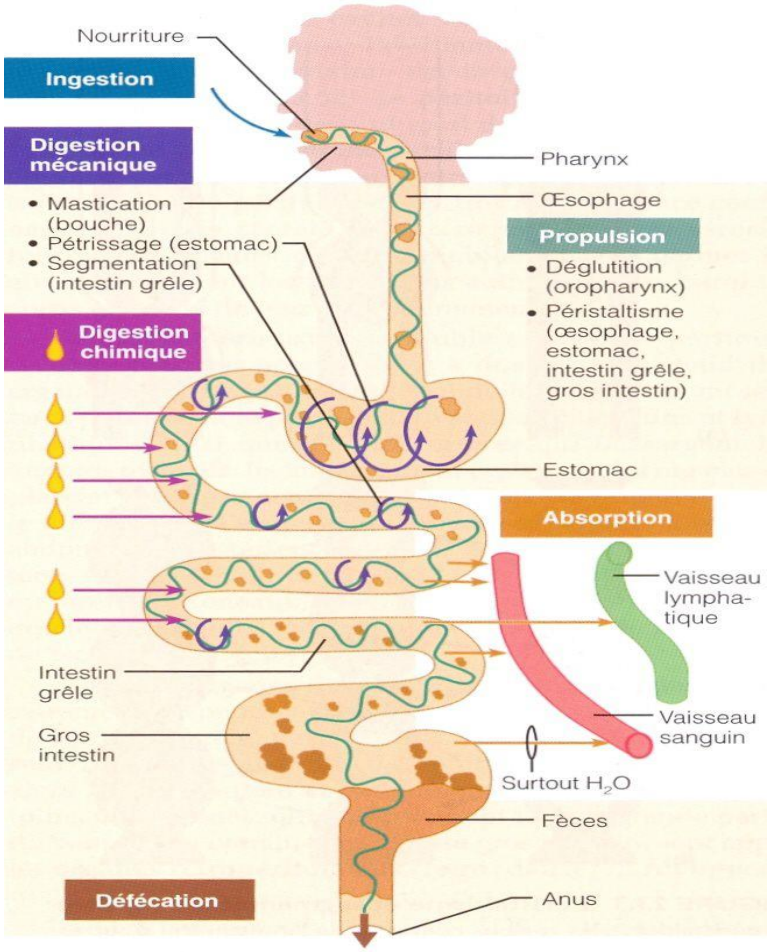


Figure 4 : Mécanisme fondamental de la fonction digestive.

II.2. Établissement de la flore microbienne

L'intestin constitue la première ligne de défense contre les envahisseurs étrangers dans le corps. Il est connu comme le "second cerveau" en raison du grand nombre de cellules immunitaires et de neurones qu'il contient. Le microbiote intestinal, également connu sous le nom de flore digestive, est composé de milliards de bactéries qui fournissent une protection considérable à l'organisme.

Le microbiote à la naissance est différent de celui trouvé chez l'adulte, et il est également plus instable. In utero, le tube digestif de l'enfant est stérile, les premières colonisations se produisant principalement par la flore vaginale, intestinale et cutanée de la mère pendant l'accouchement (O'Hara and Shanahan 2006), suivies par la digestion du lait (Clemente et al., 2012).

Comme été démontré chez le porc (Pluske, 2013; Rist et al., 2018), le lapin (Combes et al., 2011) et les ruminants (Oikonomou et al., 2013), le sevrage est une période critique du développement des mammifères. Au cours de cette periode le microbiote digestif évolue, se diversifie et se stabilise pour assurer la transition vers des aliments solides. D'autres périodes de transition, comme la parturition et le début de la lactation chez les mammifères, peuvent causer des perturbations du microbiote en raison des changements dans la qualité ou la quantité des éléments nutritifs (Martín et al., 2006).

La diversité des bactéries augmente progressivement, et à l'âge de deux ans, le microbiote s'est stabilisé pour être fonctionnellement similaire à celui trouvé à l'âge adulte. Les facteurs génétiques (Zoetendal et al., 2001), environnementaux et alimentaires (Ley, Peterson, and Gordon 2006; Turnbaugh et al., 2007, 2009) influeront tous sur l'évolution de la composition du microbiote au cours du temps.

Björkstén (2004) décrit la microflore du TGI comme un environnement riche en microbes avec 10^{13}-10^{14} cellules microbiennes. La distribution des bactéries le long du TGI n'est pas uniforme (Figure 5). En raison de son pH acide et de la présence d'enzymes digestives qui inhibent la croissance bactérienne, l'estomac est un environnement pauvre en bactérie. Par ailleurs, la concentration bactérienne augmente dans tout le tube digestif, atteignant le maximum dans le côlon (10^{11}-10^{12} UFC/ml). Ce dernier est l'habitat idéal pour nos bactéries intestinales. En effet, la température est constante de l'ordre de 37°C, le pH est légèrement acide, le transit est lent, et la nourriture et l'eau sont abondants (Whitman et al., 1998; Ley et al., 2006).

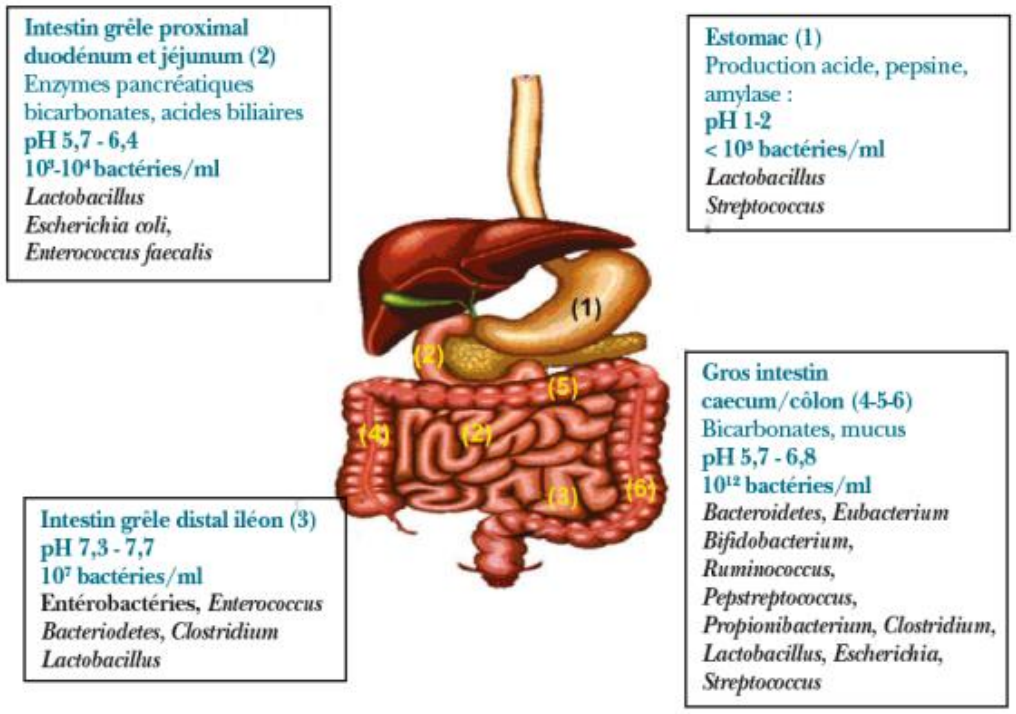


Figure 5 : Composition et concentration des espèces microbiennes le long du tube digestif.

II.3. Les fonctions de la flore microbienne

Des études menées sur l'être humain et des modèles des rongeurs suggèrent que les principales fonctions du microbiote digestif d'un individu sont de trois types : métabolique, immunitaire et protecteur (Aziz et al., 2013) (Figure 6).

❖ La fonction métabolique

Les métabolites sont synthétisés par le microbiote à partir des nutriments disponibles à la lumière du tube digestif et absorbés par l'épithélium, où ils interagissent avec divers organes soit directement ou après avoir été métabolisé par le foie. Les neurotransmetteurs, les acides gras, les acides aminés ramifiés, les métabolites des phospholipides, les triglycérides, les acides gras, les vitamines produites par les bactéries (vitamine K, vitamine B12, etc.) et les co-métabolites des acides aromatiques et phénoliques font partie des axes métaboliques de la communication hôte-microbe. Tous ces facteurs ont un effet sur la physiologie et la santé de l'hôte (Holmes et al., 2012).

❖ La fonction de barrière

La première fonction du tube digestif est la digestion. Ainsi, son épithélium doit faciliter l'absorption des nutriments tout en empêchant les bactéries, pathogènes ou non, de se déplacer (Sommer and Bäckhed 2013). Chez les porcs (Willing and Van Kessel 2007, 2009) et les

oiseaux (Bohórquez et al., 2011), l'absence de flore microbienne entraîne un défaut de la différenciation de l'épithélium intestinal, une réduction de la régénération cellulaire accompagnée d'une diminution de l'épaisseur de la villosité, et un changement de la perméabilité épithéliale. En effet, le microbiote inhibe l'implantation des bactéries pathogènes directement par des mécanismes de résistance à la colonisation et indirectement en stimulant le système immunitaire (Buffie and Pamer 2013).

- La fonction de protection

Le microbiote intestinale jouent un rôle important dans l'amélioration de la santé intestinale (Gill & Prasad, 2008; Gareau et al., 2010; Moayyedi et al., 2010). En fait, ils protègent contre les infections gastro-intestinales (diarrhée du voyageur, diarrhée infantile, diarrhée induite par les antibiotiques, etc.) et traitent les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Prantera et al., 2002; Kruis, 2004). Diverses espèces bactériennes sont impliquées dans la dégradation des polymères à partir de la paroi des cellules végétales. Ainsi, les espèces Bacteroide, Ruminococcus et Enterococcus dégradent la cellulose, l'un des principaux composants de cette paroi. Ils assurent également la fermentation, qui aide à prévenir la diarrhée causée par les sucres indigestes (Robert and Bernalier-Donadille 2003).

- La fonction immunitaire

Le microbiote joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement du système immunitaire du tube digestif (Hooper et al., 2012; Kamada & Núñez, 2013; Sommer & Bäckhed, 2013). En effet, le microbiote produit des antibiotiques et peut stimuler la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales. Il favorise également la production d'anticorps sécrétoires d'IgA et le bon fonctionnement des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, ce qui réduit l'invasion des bactéries pathogènes (Abdel-Wahhab and Kholif 2008).

Quand il y a un changement important dans la composition de la flore digestive (dysbiose) et la barrière intestinale est percée, les produits bactériens (endotoxines telles que LPS, peptidoglycanes, et flagellines) activent le système immunitaire, provoquant une inflammation nocive. Chez les humains, la dysbiose est associée à des maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn, l'ulcére et le syndrome du côlon irritable (Aziz et al., 2013).

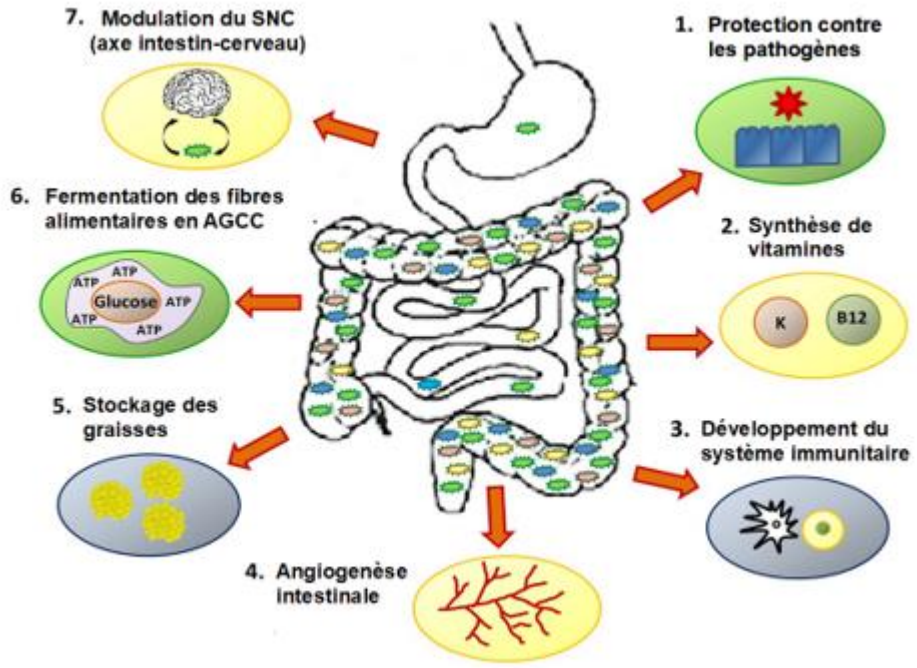


Figure 6: Rôles du microbiote intestinal (Landman and Quévrain 2016).

II.4. Le système immunitaire associé à l'intestin

Le tractus gastro-intestinal possède son propre système immunitaire et y présente jusqu'à 70 % des défenses immunitaires. Il est sous forme des tissus spécifiques tels que les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT), dans lesquels les cellules immunocompétentes sont capables de générer une réponse immunitaire efficace, en plus des ganglions lymphatiques mésentériques : amygdales cæcales et plaque de Peyer qui est situé dans la partie distale de l'iléon sous forme des agrégats de follicule lymphoïdes. Ces dernières sont composés de cellules particulières les «cellules M» qui représentent l'un des sites d'induction de la réponse immunitaire (Walter and Ley 2011).

Le système immunitaire digestif régule le microbiote intestinal au niveau local en limitant l'activation de la réponse contre les bactéries invasives dans les glandes mésentériques des mammifères, induisant une recirculation locale préférentielle des cellules T et B productrices d'anticorps, et prévenir l'activation néfaste du système immunitaire systémique. Chez les souris, une déficience immunitaire, comme l'absence d'IgA, explique le profonds changements dans le microbiote, notamment l'expansion de bactéries segmentées filamenteuses dans l'intestin grêle (Suzuki et al., 2007).

Le dialogue entre le système immunitaire et le microbiote intestinal induit une tolérance immunitaire en produisant des cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF- β), en désactivant

les macrophages et en activant un profil distinct de lymphocytes immunosuppresseurs et de T régulateurs T (Treg). De même, certaines bactéries, comme les bactéries segmentées filamenteuses qui se développent dans la muqueuse, stimulent la maturation des lymphocytes B (Imaoka et al., 2004) et de certains lymphocytes T (Chung et al., 2012).

III. Les méthodes de réduction du risque des mycotoxines : Bonnes pratiques culturales et additifs alimentaires

En raison des conséquences économiques et sanitaires de la contamination des cultures alimentaires par les champignons et les mycotoxines, il est recommandé de mettre en œuvre des stratégies de prévention (bonnes pratiques culturales au champ, à la récolte et en post-récolte) et de détoxification (Figure 7) (Wagacha and Muthomi 2008).

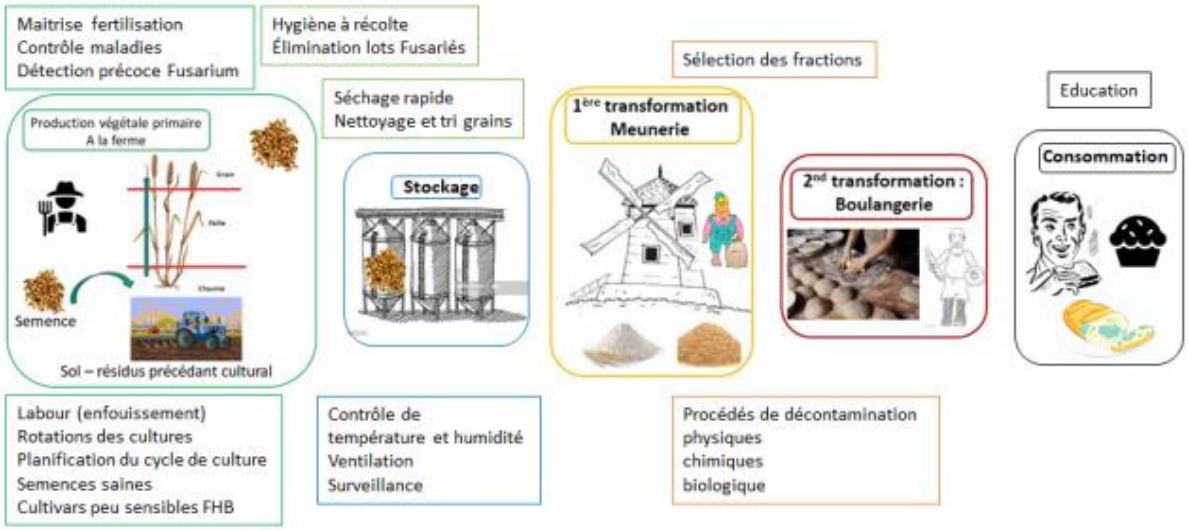


Figure 7: Stratégies de prévention et de détoxification des mycotoxines.

III.1. La prévention au champ

De nombreuses stratégies ont été élaborées pour réduire le risque d'invasion fongique et de production des mycotoxines au champ. Puisque l'inoculum fongique primaire est présent dans le sol et sur les résidus végétaux, le travail du sol (labour, rotations des cultures) et une bonne préparation du champ avant la plantation permettant une décomposition organique des résidus végétaux contaminés, ce qui réduit l'inoculum primaire. Il est également essentiel de faire la rotation des cultures après un précédent cultural susceptible à la contamination (Parry et al., 1995).

De même, la sélection de variétés de plantes résistantes aux insectes et à l'invasion fongique est très importante pour limiter l'infection des produits agricoles par les champignons.

De plus, une fertilisation et une irrigation appropriées, le désherbage, l'utilisation de biocides (fongicides, herbicides, insecticides) sont de bonnes pratiques culturales de prévention (Awuchi et al., 2021). Par ailleurs, il a été démontré que la pré-inoculation des hôtes et l'introduction de microorganismes biocompatibles (bactéries, champignons et levures non toxiques) dans le champ réduisent la contamination par les mycotoxines (Cleveland et al., 2003).

III.2. La prévention pendant la récolte

Pour éviter la prolifération des champignons et la production de mycotoxines dans les produits agricoles, il est recommandé de surveiller l'humidité et la maturité de produits agricoles pendant la récolte. Les denrées agricoles doivent être récoltés à maturité en évitant les dommages mécaniques. Avant et après utilisation, les contenants (wagons, camions) utilisés pour ramasser les denrées récoltées et les transporter du champ aux installations de séchage et d'entreposage doivent être propres, secs et exempts d'insectes, de moisissures et de toute autre matière contaminée (Millstone et al., 2002).

III.3. La prévention post-récolte

Pour éviter la croissance fongique et la toxinogenèse pendant le stockage, il est recommandé de contrôler les niveaux d'humidité et de température des produits stockés en plaçant des capteurs de température et d'humidité dans les lieux de stockage (silo ou autre). Les opérations de refroidissement combinées aux systèmes de ventilation sont importantes pour éviter toute aggravation de l'activité fongique. De plus, la rotation des grains de temps à l'autre peut diminuer la présence des taches d'humidité à l'intérieur du lieu de stockage (Jouany 2007).

III.4. Les méthodes de détoxification des mycotoxines

La mise en œuvre de mesures préventives fondées sur le respect de bonnes pratiques culturales en pré- et post-récolte permet de réduire le développement fongique et la production de mycotoxines. Cependant, en raison de plusieurs facteurs environnementales, l'agriculteur ne peut pas contrôler tous les facteurs de contamination et garantir l'absence totale de mycotoxines dans les denrées agricoles, nécessitant le recours à la détoxification. En effet, des méthodes fondées sur des processus physiques, chimiques et biologiques ont été développées pour éliminer, inactiver ou réduire la biodisponibilité des mycotoxines (Yiannikouris et Franc, 2004; V Niderkorn et al., 2006, 2007).

En 2009, le règlement européen 386/2009 a autorisé l'utilisation d'additifs alimentaires capables de réduire ou de supprimer l'absorption intestinale des mycotoxines, de promouvoir

leur excrétion, de modifier leur mode d'action et d'atténuer leurs effets potentiellement nocifs sur la santé animale et humaine (Commission européenne, 2009).

III.4.1. Les méthodes chimiques

La chimie-prévention est une stratégie utilisée pour résoudre le problème des mycotoxines dans les populations à haut risque de contamination. Ceci implique l'utilisation d'agents naturels ou synthétiques pour bloquer, retarder ou moduler le mécanisme d'action des mycotoxines (Gupta and DuBois 2001): les chlorophyllines, les polyphénols dérivés du thé vert. Ainsi plusieurs recherches ont montré que le thé vert inhibe l'initiation de l'hépatocarcinogenèse induite par l'AFB1 chez le rat en modulant son métabolisme (Qin et al., 1997).

Certaines mycotoxines sont à l'origine du stress oxydatif, c'est pourquoi il est possible d'utiliser des antioxydants en raison de leurs propriétés protectrices. Le sélénium (Se), oligo-élément essentiel, est un composant des sélénoprotéines, qui jouent des rôles critiques dans de nombreux processus physiologiques, et la glutathion peroxydase (GSH-Px), qui protège les cellules contre les agents oxydants. La complexation des mycotoxines à l'ADN est également prévenue par les vitamines A, D et E. Les riboflavines et les caroténoïdes ont produit des résultats comparables (Galvano et al., 2001). En outre l'ammoniaque, les bisulfites sont pratiques et efficaces pour la détoxication des mycotoxines dans les denrées alimentaires et l'alimentation du bétail (Doyle and Marth 1978; Park 1993).

III.4.2. Les méthodes physiques

Le lavage à l'eau ou au carbonate de sodium, le séchage, le broyage, la séparation manuelle ou mécanique des grains contaminés, sont tous des processus physiques pour la détoxification des mycotoxines.

L'utilisation d'un adsorbant, une substance capable de séquestrer les mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal de l'animal et de réduire leur toxicité ainsi que leur biodisponibilité en facilitant leur élimination dans les selles, présente un potentiel prometteur pour les applications industrielles de l'alimentation animale (El-nekeety et al., 2011; Firmin 2011). Les adsorbants inorganiques (par exemple, les carbones actifs, les aluminosilicates comme les zéolites, les bentonites, les montmorillonites, les aluminosilicates de sodium et de calcium (HSCAS) et les résines synthétiques telle que la cholestyramine ont été utilisés comme des adsorbants des mycotoxines (Guerre 2000).

En outre, les argiles et les charbons actifs sont généralement efficaces *in vitro* et *in vivo* pour séquestrer l'AFB1 et réduire l'excrétion de l'AFM1 dans le lait (Firmin 2011).

Les rayonnements électromagnétiques tels que les rayons gamma, les rayons X, les ultraviolets, les infrarouges, les micro-ondes et les ondes radio montre une excellente efficacité dans l'élimination des champignons et la dégradation des mycotoxines dans divers produits alimentaires tels que les céréales, les noix, les épices et les huiles (Calado et al., 2018, 2014; Luo et al., 2020; Mir et al., 2021; Yang et al., 2020). Plusieurs études en Tunisie ont démontré l'éfficacité de l'utilisation d'irradiation gamma pour réduire la contamination par les mycotoxines (OTA et AFB1) dans des produits alimentaire (Maatouk et al., 2019; Ben Mustapha et al., 2014; Ben Amara et al., 2022; Mehrez et al. 2016).

Les méthodes physiques et chimiques traditionnelles présentent certaines limites, telles qu'une efficacité limitée, des problèmes d'innocuité, une perte de la valeur nutritionnelle et l'appétibilité des aliments pour animaux.

Aujourd'hui, les stratégies biologiques sont l'une des méthodes les plus recommandées en appliquant un microorganisme sans danger dans les aliments pour prévenir la prolifération fongique et la production des mycotoxines (Shehata et al., 2019; Ben Taheur et al., 2019; Tantaoui-Elaraki et al., 2018).

III.4.3. Les méthodes biologiques

L'une des stratégies bien connue de réduction des mycotoxines dans les denrées alimentaires est la décontamination biologique à l'aide de microorganismes. En fait, l'efficacité d'un adsorbant de mycotoxines dans la détoxification est définie par sa capacité à se lier aux mycotoxines, empêchant leur absorption gastro-intestinale et réduisant ainsi les effets toxiques chez les animaux.

L'utilisation de levures pourrait être proposée comme approche possible pour le contrôle biologique des mycotoxines puisque la levure exerce un effet bénéfique en inhibant la croissance des champignons et en limitant la production des mycotoxines. La levure S*accharomyces cerevisiae* et ses souches se sont révélés extrêmement bénéfiques. Certaines souches de *S. cerevisiae* se sont montrées capables de dégrader jusqu'à 38 % de l'OTA (Štyriak et al, 2001). L'ajout d'extraits de parois de ces levures réduit l'absorption de l'AFB1 et augmente l'élimination de l'AFM1 dans les fèces de brebis (Firmin 2011).

Bejaoui et al. (2004) ont constaté que l'ajout des 2 souches *S. cerevisiae* et *S. bayanus* dans le jus de raisin synthétique a éliminé 45% des concentrations de l'OTA et réduit la concentration d'AFB1 dans les arachides à un taux de 74,4 % (Armando et al., 2012; Prado et al., 2011). Taheur et al. (2017) ont montré la capacité des levures isolées d'une culture de kéfir (*K. servazzii* KFGY7, etc.) à absorber 82% à 100% d'AFB1, de ZEN et d'OTA. Abdel-Kareem

et al. (2019), ont montré la capacité de *S. cerevisiae* à inhiber 85% de la croissance d'*Aspergilus flavus* et ils ont suggéré une dégradation comme un mécanisme de détoxification, puisqu'il y a une production extensive d'exo-chitinase qui est une enzyme lytique extracellulaire. De plus, certains composés de levure, comme les -D-glucanes, ont des propriétés anti-oxydantes (Jaehrig et al., 2008) ou encore immunomodulatrices (Volman et al., 2008). De plus, la levure a été considéré comme probiotique (Volman et al., 2008), ce qui pourrait réduire les effets toxiques des mycotoxines.

IV. Les bactéries lactiques

L'exposition à long terme et l'accumulation de mycotoxines dans différents organes et tissus entraînent de graves problèmes de santé qui encouragent de nombreux chercheurs à élaborer des stratégies biologiques fondées sur l'utilisation de bactéries bénéfiques naturellement présentes dans les aliments (Abbès, Ben Salah-Abbès, et al., 2013; Belgacem et al., 2019; Jebali et al., 2018; Ben Salah-Abbes et al., 2015).

IV.1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, immobiles, non sporulées et qui peuvent vivre dans des environnements anaérobies ou aérobies. Elles dépourvues de cytochrome-oxydase, de catalase, et de nitrate-réductase. Toutes les LAB ont la capacité de fermenter les sucres en acide lactique. Certains sont appelés homo-fermentaires parce qu'elles produisent beaucoup d'acide lactique, tandis que d'autres sont appelés hétéro-fermentaires parce qu'elles produisent de l'acide lactique avec d'autres composés (habituellement de l'acétate et de l'éthanol) (Adams and Marteau 1995; Salminen et al., 2002).

Les LAB sont présentes dans un large éventail de niches écologiques, ainsi que dans les muqueuses humaines et animales et le tube digestif des mammifères. Pendant des siècles, elles ont été largement utilisées dans la production d'une grande variété d'aliments fermentés, y compris les produits laitiers (Tamminen et al., 2004). De plus, elles sont dépourvues de toute toxicité pour le consommateur c'est pourquoi elles bénéficient d'un statut GRAS (Generally Recognized As Safe) (Mohamadzadeh et al., 2005; Moslehi-Jenabian et al., 2010).

Les LAB peuvent également produire des agents antibactériens comme les bactériocines, de petits peptides protéiques ou des peptides ayant des activités bactéricides ou des bactériostatiques, qui contribuent à réduire considérablement la viabilité des bactéries pathogènes. En conséquence, Elles augmentent la sécurité en réduisant les risques de consommer des produits dangereux (Cotter et al., 2005; Drider et al., 2006; Magnussen et Parsi, 2013).

IV.2. Activités bénéfiques des bactéries lactiques

Elles sécrètent des anti-microbes, de faible poids moléculaire, ayant des propriétés antifongiques contre les champignons pathogènes, et elles ont la capacité de réduire le pH liminale ou d'empêcher par compétition d'autres bactéries d'adhérer aux cellules épithéliales (Cabo et al., 2002; Sjögren et al., 2003).Les acides organiques, les bactériocines, les antibiotiques, les dipeptides cycliques, le peroxyde d'hydrogène, les composés protéiques et les acides gras hydroxylés sont des exemples d'anti-microbes (Ingrassia et al., 2005; Beganović et al., 2011; Wang et al., 2017).

Les LAB présentent plusieurs avantages potentiels pour la santé et la nutrition, notamment l'amélioration de la valeur nutritionnelle des aliments, la lutte contre les infections gastro-intestinales, l'amélioration de la digestion du lactose et le contrôle du cholestérol sérique (Ouwehand et al., 2002; Saxelin et al., 2005). Ces avantages découlent d'une large activité et mécanisme biologique (Lin et al., 2003).

Certaines souches de LAB ont été utilisées comme probiotiques, qui sont des organismes vivants qui profitent à la santé de l'hôte après l'administration orale en quantité adéquate, en raison de leur résistance aux conditions gastro-intestinales, de leur adhésion à l'épithélium intestinal et de la prévention de la croissance ou de l'invasion de bactéries pathogènes dans l'intestin de l'animal (Saxelin et al., 2005; Felis & Dellaglio, 2007).

IV.3. Interaction bactéries lactiques/ mycotoxines

La détoxification biologique des mycotoxines chez les organismes humains et animaux en utilisant des LAB est une méthode nouvelle et très prometteuse. De nombreuses études ont été réalisées afin d'accéder à l'effet détoxifiant de LAB contre les mycotoxines (Lahtinen et al., 2004; V Niderkorn et al., 2006; Belkacem-Hanfi et al., 2014; Elsanhoty et al., 2014).

Les LAB peuvent produire des composés de faible poids moléculaire avec une activité antifongique tels que les acides organique, acides gras, acides carboxyliques et bactériocine (Dalié et al., 2010; Shehata et al., 2018, 2019). Abouloifa et al. (2021) ont étudié l'activité antifongique de 14 souches de *Lactobacillus* (*L. plantarum, L. pentosaceus* et *L. brevis*) isolées des olives vertes fermentées. Ils ont touvé que toutes les souches ont une activité antifongique élevée contre les champignons (Aspergillus niger, Penicillium sp, Fusarium oxysporum et Rhizopus sp).

Après la consommation, la stabilité et la résistance du complexe bactérie-toxine dans le tractus gastro-intestinal détermine l'efficacité potentielle des LAB à se lier aux mycotoxines. En effet, les LAB ont une grande capacité d'adhésion à la muqueuse intestinale en raison de

leur adaptation naturelle à l'environnement intestinal (Ezdini et al., 2020; Jebali et al., 2018). Une fois libéré dans l'intestin, les LAB adsorbent les mycotoxines, ce qui réduit potentiellement leurs effets toxiques (Hathout and Aly 2014; Khalil et al., 2015).

Plusieurs études ont révélé que les souches de *Lactobacillus* pourraient être utiles pour diminuer l'immunotoxicité, la génotoxicité, le stress oxydatif et les dommages histopathologiques causés par les mycotoxines comme *Lactobacillus casei* (Ezdini et al., 2020; Hathout et al., 2011) *lactobacillus plantarum* (Belgacem et al., 2019; Jebali et al., 2018; Ben Salah-Abbes et al., 2015) et *Lactobacillus rhamnosus* (Abbès, Salah-Abbès, et al., 2013; Haskard et al., 2001). Ces auteurs ont proposé que la diminution des effets néfaste causé par les mycotoxines (AFB1, AFM1, FB1, ZEN et OTA) était généralement liée à une diminution de la biodisponibilité de ces toxines dans le tractus gastro-intestinal, indiquant ainsi la réduction de leur concentration dans leurs organes cibles.

Comme il a été démontré précédemment que les animaux nourris avec une alimentation contaminée par des mycotoxines, ont une augmentation significative d'EROS dans le foie et les reins, indiquant des lésions hépatiques et rénales (Shyamal et al., 2010). Pour cela l'utilisation des LAB est révélé très efficace car elles sont capables de synthétiser des polysaccharides extracellulaires dotés d'activités physiologiques et thérapeutiques importantes, ainsi que d'activités antioxydantes et de piégeage des radicaux libres (Kodali and Sen 2008). Aussi certaines LAB sont non seulement capable de réduire le risque d'accumulation des EROS mais peuvent les dégrader (Liu and Pan 2010).

L'AFB1 est dégradée et utilisée comme source de carbone par certaines bactéries du sol telles que *Flavobacterium aurantiacum* et *Mycobacterium fluoranthenivorans* et du microbiote du rumen telle que *Eubacterium* souche BBSH 797 (Wu et al., 2009).En plus, Megalla et Mohran (1984**),** ont utilisé une souche bactérienne, *Lactococcus lactis* ATCC 11454, pour transformer l'AFB1 en aflatoxine B2a, qui est 18 fois moins toxique que l'AFB1, et l'aflatoxicol, qui est exempt de toxicité. En outre, *Lactobacillus crispatus* M247 et *Lactobacillus rhamnosus GG* ont la capacité de fixer également l'AFB1 avec une pourcentage allant de 5 à 86 % (Haskard et al., 2000; Peltonen et al., 2000).

V. Les argiles

V.1. Généralité

Le terme générique "argile" est couramment utilisé pour décrire diverses roches sédimentaires et cristallines à forte teneur minérale. L'argile est l'un des matériaux les plus anciens du monde, datant de la formation de la planète. Il peut être trouvé dans plusieurs

domaines, y compris la construction, la pétrochimie, l'alimentation, les plastiques et la médecine. C'est une substance rocheuse naturelle composée de silicates ou d'aluminosilicates hydratés à structure lamellaire, résultant en général de la transformation des silicates à charpente tridimensionnelle. Il pourrait s'agir d'une matière localement abondante et diversifié qui a été traité ou raffiné avant son utilisation, avec des propriétés desséchantes, absorbantes ou dégraissantes, ainsi que des propriétés collantes ou réfractaires. Il résiste aux chocs, aux déformations, à la chaleur et aux rayons UV...etc.

Il existe de nombreuses applications pour l'argile. Il est utilisé pour décolorer les huiles en agroalimentaires, dans l'industrie pétrolière pour les fourrages et le raffinage pétrochimique, et dans la fabrication de céramique pour les prothèses dentaires. De plus, des couches d'argiles ont été découvertes dans des installations de stockage de déchets radioactifs (Picard 1994). De même, l'ajout d'argile à l'eau de reproduction du truite arc-en-ciel a réduit les pathologies brachiales en réduisant la colonisation des branches par les protozoaires (Goldes et al., 1988).

Les argiles, ou silicates d'aluminium, sont disponibles en pharmacie comme médicaments pour traiter les pathologies digestives telles que le syndrome du côlon irritable, les manifestations douloureuses pendant les maladies oesophageo-gastro-duodénales et la diarrhée aigue. De même, l'argile avec sa liaison au mucus améliore ses caractéristiques et diminue sa dégradation (Allègre 2012). De plus, l'argile raccourcit la durée et la fréquence des diarrhées chez les adultes et les enfants (Khediri et al., 2011; Guarino and Giannattasio 2011).

La pepsine peut causer des gastrites, des ulcères digestifs et des hémorragies si elle est sécrétée en excès. En effet, un gramme de kaolinite (argile) absorbe 0,20 g de pepsine (Leonard 1994). Il y a des bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques telle que *E. coli et* Staphylococcus aureus sont également anéanties à différents types d'argile (Williams and Haydel 2010).

Plusieurs études ont indiqué que l'argile actuellement utilisée comme agent antiagglomérant pour l'alimentation animale pourrait prévenir les maladies associées à l'aflatoxicose chez les animaux d'élevage (Phillips 1999).

V.2. Interaction argiles-mycotoxines

L'incorporation de minéraux argileux non nutritifs dans les aliments devient une approche pratique d'intérêt actuel pour la prévention de l'aflatoxicose, il permet d'absorber les aflatoxines dans l'estomac et le tractus intestinal, réduisant ainsi la biodisponibilité des toxines et leur distribution dans le sang, le foie et d'autres organes cibles (Phillips et al., 1995).

Dans le tractus gastro-intestinal, l'aluminosilicate de calcium et de sodium hydraté (HSCAS) peut constituer une source d'éléments chimiques tels que le fer, le sodium et le

calcium en raison de sa capacité élevée d'échange cationique. En effet, le HSCAS été capable d'absorber les mycotoxines in vitro (Abdel-Wahhab et al., 2015). Abbès et al. (2007) ont suggéré que le HSCAS peut lier la ZEN dans le tractus gastro-intestinal et peut être considéré comme un bon candidat pour la réduction des effets cytogénétiques causés par les Afs (Abdel-Wahhab et al., 2002) ou la détoxification des aliments contaminés par la ZEN (Abbès, Salah-abbès, et al., 2006). De plus, Abdel-Wahhab et al. (1998, 1999b, 2002) ont reporté que le HSCAS été efficace dans la protection des animaux de laboratoire des effets toxiques des mycotoxines. En effet, l'ajout de 0,5 g d'argile par kg de nourriture contaminée a permis d'inverser jusqu'à 85% des effets toxiques des aflatoxines, tels que les lésions hépatiques et les aberrations chromosomiques. Le complexe aflatoxine / argile est ensuite excrété dans les matières fécales.

Dans l'étude de Abdel-Wahhab et al. (2005), le HSCAS et la montmorillonite ont réussi à réduire l'effet clastrogène de la sterigmatocystin. Abbès et al. (2008) ont montré le rôle protecteur de la montmorillonite contre la toxicité des AF, en raison de la capacité de cette argile minérale à lier cette toxine in vitro ou dans le tractus gastro-intestinal et à réduire sa toxicité biochimique et immunologique. D'autre part, Abdel-Wahhab et al. (2015) ont signalé que le co-traitement avec le DON plus la montmorillonite a réussi à normaliser les niveaux élevés de paramètres biochimiques, à diminuer la cytotoxicité de la moelle osseuse et à améliorer la génotoxicité hépatique.

Plusieurs études montrent que l'argile, HSCAS, n'a pas d'impact négatif sur la santé globale de l'animal aux différentes doses testées, car il ne peut pas traverser la muqueuse intestinale et revenir dans la circulation sanguine (Abbès et al., 2006, 2007) .

MATERIEL & METHODES

MATERIEL

I. Matériel biologique

I.1. Les échantillons de blé dur

Un total de 136 échantillons de blé dur a été collecté en Tunisie dans 2 régions climatiques différentes, Kairouan (zone continentale sèche) et Béja (zone littorale humide), en différents points de la filière : au champ, à la récolte, au pré-stockage et au stockage avec 46 échantillons en 2020 et 90 échantillons en 2021 (Tableau 5).

Tableau 5: Nombre d'échantillons de blé dur collectés en Tunisie en 2020 et 2021 dans les deux régions climatiques, Béja et Kairouan.

Points de collecte	2020		2021	
	Béja	Kairouan	Béja	Kairouan
Au champ	-	10	-	20
A la récolte	15	-	30	10
Au pré-stockage	11	5	-	-
Au stockage	-	5	10	20
Total	**26**	**20**	**40**	**50**

I.2. Les souris

Dans cette étude, nous avons utilisé des souris males Balb/c, âgées de 6 à 7 semaines. Elles ont été maintenues dans l'animalerie du laboratoire pendant 20 jours pour s'acclimater à des conditions contrôlées avec une température entre 20 et 23 °C, une humidité relative de 50% et une photopériode (12 h d'obscurité/12 h de lumière).

Les souris sont nourries avec des granules industriels et de l'eau *ad libitum*. Elles ont été réparties dans des cages en acier inoxydable convenablement aérées. Elles sont équipées d'un couvercle grillagé muni d'un endroit pour y mettre la bouteille d'eau et la nourriture. Les dimensions et la structure de ces cages sont conformes aux recommandations de la Commission nationale pour l'expérimentation animale et du Comité d'éthique de l'Institut supérieur de biotechnologie de Monastir.

I.3. Les bactéries

Dans cette étude, nous avons évalué le pouvoir préventif de 3 bactéries lactiques de genre *Lactobacillus* isolées de beurre traditionnel : *L. plantarum* MON03 (LP), bactérie isolée de la région de Monastir, *L. paracasei* BEJ01 (LB), bactérie isolée de la région de Béja et *L. rhamnosus* GAF06 (LR), bactérie isolée de la région de Gafsa vis-à-vis de la toxicité des

mycotoxines (AFB1, OTA, ZEN, AFM1, ENB) in vitro et des mycotoxines (AFM1, AFB1 et ZEN) in vivo. Les bactéries ont été conservées sous forme lyophilisée jusqu'à la période de traitement.

I.4. Les lignées cellulaires

Les cellules Véro (cellules de rein de singe), Caco-2 (cellules carcinogènes du côlon humain), C5-O (kératinocytes murins), HepG2 (cellules carcinogènes du foie) et les leucocytes humains sont utilisés pour évaluer la relation dose-réponse en présence de la BT et de la LP. Les cellules Caco-2 sont des adénocarcinomes colorectaux dérivés de cellules tumorales humaines isolées de l'intestin.

Ces cellules peuvent se différencier pour former un épithélium qui ressemble à une barrière intestinale fonctionnelle. Les cellules Véro constituent une ligné cellulaire obtenue par la culture des cellules épithéliales du reins d'un singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*), ce sont l'une des lignées mammaliennes les plus couramment utilisées en microbiologie et en biologie moléculaire et cellulaires. Les C5-O sont des lignées cellulaires qui représentent 85 % de la couche superficielle de la peau (épiderme) et des phanères d'un modèle animales (souris, rats). Les cellules HepG2, ce sont des cellules carcinogènes du foie.

Les cellules utilisées dans cette étude sont fournies par l'Institut National de Génie Génétique et de Biotechnologie (NIGEB), Téhéran, Iran.

I.5. L'argile

L'argile de type Montmorillonite (Bentonite, BT) est collectée de site argileux de Zeramdine et purifiée pour utilisation dans des études *in vitro* et *in vivo*. Le gisement d'argile se trouve dans le centre-est de la Tunisie. Dans ce gisement les couches se présentent avec un pendage de 20 à 30 vers le nord-est. Le niveau argileux est caractérisé par une couleur verte et par une épaisseur qui est dans certain endroit peut atteindre jusqu'à 30 mètres. 10 kg d'argile ont été prélevé du niveau supérieur du gisement. L'argile est séchée à l'air libre afin d'éliminer l'humidité et de faciliter le concassage. La procédure de purification est effectuée selon la méthode proposée par Annabi-Bergaya, 1978 puis broyée et tamisée à 63 µm.

II. Les produits et les réactifs chimiques utilisés pour l'analyse multi-mycotoxines des échantillons de blé dur

Les standards de mycotoxines [les 4 aflatoxines (AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2), OTA, fumonisine B1 (FB1), fumonisine B2 (FB2), DON, ZEN, les toxines T-2 (T2) et HT-2 (HT2), CIT, BEA, les 4 enniatines (ENA, ENA1, ENB, ENB1), nivalénol (NIV), fusarénon-X (FUS-

X), néosolaniol (NEO), 15-acetyldéoxynivalénol (15ADON) and 3-acetyldéoxynivalénol (3ADON)] ont été achetés chez R-Biopharm (France).

Les standards internes (U-[13C17]-AFB1 pour AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 ; U-[13C34]-FB1 pour FB1 et FB2; U-[13C20]-OTA pour OTA et BEA; U-[13C18]-ZEN pour ZEN, ENB, ENB1, ENA et ENA1, et U-[13C15]-DON pour DON) ont été achetés chez Libios (France).

La solution de travail de standard composite et de standard interne de toutes les mycotoxines a été préparée en dissoudre des volumes appropriés de chaque composé dans la phase mobile A : 99.5% d'eau et 0.5% d'acide acétique. Les solutions stocks ont été ensuite diluées avec la phase mobile A pour préparer les solutions d'étalonnage. Toutes les solutions ont été stockées à – 20°C dans des flacons en verre ambré et à l'obscurité avant utilisation.

L'acétonitrile a été acheté chez Fischer chemical (Loughborough, UK) et l'acide acétique (LC grade) a été acheté chez Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). L'isopropanol a été acheté chez Biosolve (Dieuze, France) et l'acide acétique (LC-MS/MS grade) chez Sigma (St Louis, MO, USA). Un kit roQ QuECheRS EN 15562 a été acheté chez Phenomenex (Torrance, USA). L'eau ultra pure a été produite par un système Milli-Q, Synergy Merk Millipore (Darmstadt, Allemagne).

METHODES

I. Étude de la présence des mycotoxines dans les échantillons de blé dur

I.1. Collecte des échantillons de blé dur en Tunisie

I.1.1. Régions d'étude

Deux régions productrices de blé dur de climat différent ont été sélectionnées : Béja (région humide/littorale) et Kairouan (région sèche/continentale) (Figure 8).

Béja est située dans le nord-ouest de la Tunisie (latitude : 36°43'32"N ; longitude : 9°10'54"E ; altitude : 148 m). Elle possède 374 000 ha de superficie totale et 372 973 ha de terres agricoles, dont 91,2 % sont cultivables. Elle produit 30% de blé dur et 25% de blé tendre de la production céréalière nationale (MARHP, 2021). Elle a produit 161 462 tonnes de blé dur en 2020 et 212 827 tonnes en 2021. Elle a un climat variable de type humide à subhumide avec un été chaud et sec et un hiver pluvieux et froid. La moyenne annuelle des précipitations varie entre 600 et 1200 mm/an.

Kairouan est une ville de la région centrale de la Tunisie (latitude : 35°40'41"N ; longitude : 10°05'46"E ; altitude : 65 m). Elle possède 671 000 ha de superficie totale et 590 000

ha de terres agricoles. Cette région représente 6% de la production céréalière totale. Elle a produit 39 593 tonnes de blé dur en 2020 et 44 616 tonnes en 202. Elle a un climat aride à semi-aride, avec un été chaud et sec et un hiver frais. En décembre, la température moyenne est de 9°C, et en juillet, elle est de 34°C. Le climat est influencé par les vents maritimes et sahariens. L'Est est soumis à de forts vents depuis le Sahel, entraînant des baisses de températures et une augmentation des précipitations, notamment en hiver.

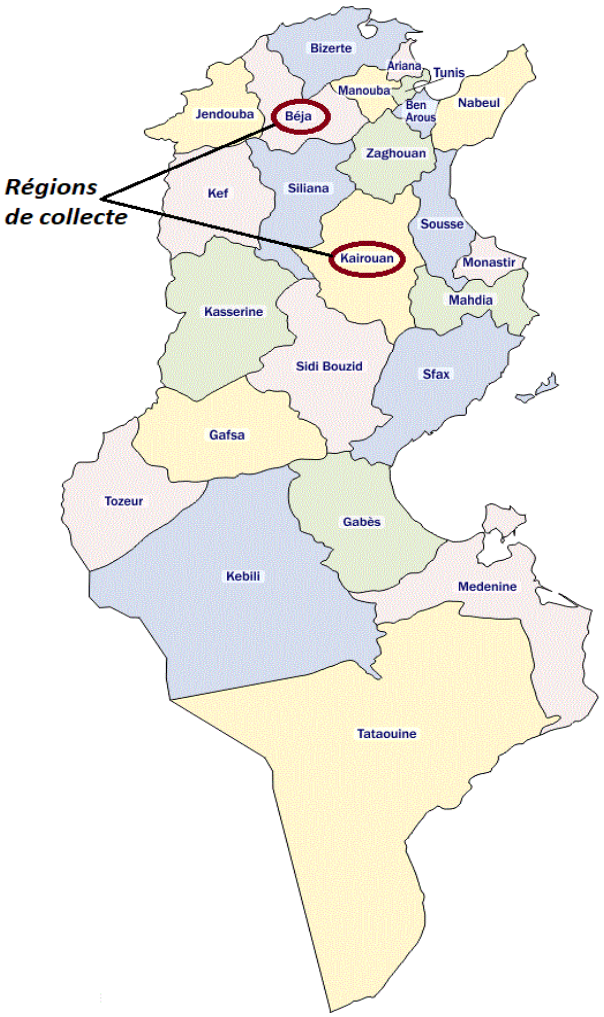


Figure 8 : Les régions de collecte des échantillons de blé dur.

I.1.2. Les points et les procédures de collecte le long de la filière blé dur

I.1.2.1. Collecte des échantillons d'épis de blé dur au champ

Pour cette filière, la collecte n'a été faite que dans la région continentale. Les épis de blé ont été collectés à maturité selon la méthode de Riba et al. (2010) dans des champs d'une superficie ≤ 1.5 ha. Dans chaque champ, deux échantillons ont été collectés et chaque échantillon composé de 110-120 épis a été collecté le long de la diagonale en 5 points différents

éloignés de 15 à 20 m. Les épis de blé ont ensuite été décortiqués à la main et les grains ont été conservés dans des sacs en plastique à température ambiante dans un endroit sec à l'abri de la chaleur et de l'humidité.

I.1.2.2. Collecte des échantillons de grains de blé en post-récolte

La collecte des échantillons de grains de blé dur a été faite à la récolte, au pré-stockage et au stockage. Au champ, les agriculteurs récoltent le blé dans des sacs de polypropylène et ces sacs sont mis dans un endroit sec au soleil pendant 5 à 7 jours. Ensuite, une partie du blé récolté qui est destinée à l'autoconsommation ou à la vente aux unités de transformation est stockée pendant 2 à 3 mois chez les agriculteurs (pré-stockage) tandis que l'autre partie est séchée au soleil et stockée dans des hangars (ouverts ou fermés) pendant la campagne agricole suivante (stockage pendant un an).

L'échantillonnage a été fait selon le règlement (CE) No 401/2006 portant sur la fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires (Commission européenne 2006).

Le mode de prélèvement d'échantillons pour les céréales et les produits dérivés est indiqué dans le tableau 6.

La fréquence d'échantillonnage (n) est le nombre d'emballages individuels qui séparent le prélèvement de deux échantillons élémentaires, chaque collecte est effectuée tous les tantièmes sacs (les chiffres décimaux sont arrondis au nombre entier le plus proche).

n = (poids du lot de l'échantillon élémentaire)/ (poids de l'échantillon global x poids de l'unité de vente au détail).

Tableau 6: Nombre d'échantillons élémentaires à prélever en fonction du poids du lot de céréales et de produits dérivés (Commission européenne, 2006).

Poids du lot (en tonnes)	Nombre d'échantillons élémentaires	Poids de l'échantillon global (en kg)
$\leq 0,05$	3	1
$> 0,05 \leq 0,5$	5	1
$> 0,5 \leq 1$	10	1
$> 1 \leq 3$	20	2
$> 3 \leq 10$	40	4
$> 10 \leq 20$	60	6
$> 20 \leq 50$	100	10

➢ Exemple de calcul : un échantillon de blé stocké

- Lieu de stockage : sacs de 50 kg mis dans des hangars.
- Un agriculteur a 7 sacs de blé stocké.
- Poids du lot = 7*50 kg = 350 kg = 0.35 tonnes et 0,05 < **0.35** < 0,5.
- n = (350 kg * 0.1 kg) / (1 kg * 50 kg) = 1

=> Le poids du lot est égal à 0.35 tonnes, donc le nombre des échantillons élémentaires est égal à 5, le poids de l'échantillon global est égal à 1 kg et la fréquence d'échantillonnage est égal à 1.

I.1.3. Collecte des informations relatives à chaque échantillon

Pour chaque échantillon collecté, des informations sur l'historique de l'échantillon ont été renseignées. Pour cela, des questionnaires ont été appliqués pour les agriculteurs sur le terrain : variété de blé, superficie des champs, poids du lot initial, date de récolte du blé au champ, pratiques d'irrigation, type de fertilisation, traitements phytosanitaires, labour, enlèvement des débris de blé d'une année à l'autre, quantité récoltée et précédant cultural.

I.1.4 Broyage et répartition des échantillons de blé dur

Les 136 échantillons de blé dur prélevés ont été homogénéisés avec une spatule stérile et pour chaque échantillon, 250 à 300 g ont été broyés avec un mixeur blender (granulométrie < 1,7 mm). Un sous-échantillon de 100 g a été mis dans un sac plastique scellé à 4 °C pour déterminer l'activité de l'eau et la teneur en eau, et le reste de l'échantillon broyé a été mis à -20 °C pour l'analyse des mycotoxines.

I.2. Teneur en eau

La teneur en eau (mc) d'un produit est définie comme étant la perte de masse subie par le produit dans des conditions spécifiques et elle est exprimée en pourcentage (%). La mc des échantillons de blé a été déterminée selon la norme française ISO 712:2009 (ISO, 2009).

La mc a été déterminée en pesant 5 g de blé broyés dans une capsule métallique qui a été séchée au préalable dans une étuve à la température comprise entre 130 °C et 133 ° et refroidie à la température ambiante (30 à 45 min dans un dessiccateur). Les capsules contenant l'échantillon ont été placées ouvertes avec son couvercle dans l'étuve pendant 90 minutes. La mc a été déterminée en duplicata et lorsque la différence entre les deux résultats dépassait 0,15 g d'eau par 100 g d'échantillon, le mesure a été répétée.

La mc exprimée en % est donnée par l'équation suivante :

$$mc = \left(\frac{m1}{m0}\right) \times 100\%$$

m0: masse en gramme de la prise d′essai

m1: masse en gramme de la prise d′essai après séchage

I.3. Activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) de l'échantillon broyé (5 g) a été déterminée en duplicata en utilisant un Aqualab 4TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) calibré avec une solution saturée de NaCl. Selon le principe de la méthode, un faisceau infrarouge focalisé sur un petit miroir détermine la température précise du point de rosée de l'échantillon. Cette température de point de rosée est alors traduite en activité de l'eau.

I.4. Analyse multi-mycotoxines

I.4.1. Extraction des mycotoxines

L'extraction des mycotoxines a été faite selon la méthode de QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) décrite par Moreau et Lev (2014) avec quelques modifications. Cinq grammes de chaque échantillon de blé broyé ont été mis dans des tubes coniques de polypropylène de 50 ml. Ensuite, 20 ml du solvant d'extraction composé d'acétonitrile, d'eau ultrapure et d'acide acétique (49,5/49,5/1 : v/v/v) ont été ajoutés et le mélange a été agité à l'aide d'un rotateur vertical multifonction (Grant-Bio PTR-35) pendant 15 min à une vitesse de 100 rpm. Ensuite un kit roQ QuECheRS EN 15562 a été ajouté, et le mélange a été agité à nouveau pendant 10 min. Après centrifugation (9000 rpm/10 min), 200 µl du surnageant ont été transférés dans un flacon de 2 ml avec l'ajout de 600 µl d'eau ultra pure / acide acétique (99,5/0,5 : v/v). La solution a été filtrée à l'aide d'un filtre seringue Clearline PTFE (polytétrafluoroéthylène) de 0,45 µm, et 100 µl d'un mélange de standards internes ont été ajoutés à 400 µl du filtrat.

I.4.2. Détection et quantification des mycotoxines

Les mycotoxines ont été analysées selon le protocole décrit par Moreau and Lev (2014) par chromatographie en phase liquide ultra-haute-performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse avec un filtre triple quadripôle (LCMS-8040) (Shimadzu, Tokyo, Japon), et quantifiées par un isotope marqué (un étalon interne marqué).

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Lab Solutions (v5.91/2017, Shimadzu, Tokyo, Japon, 2017).

- ✓ <u>Les conditions de l'UHPLC :</u>

La séparation chromatographique des mycotoxines a été effectuée par UHPLC en phase inverse à l'aide d'un Phenomenex Kinetex® 2,6 µm C18 100 Å, Colonne LC 50 x 2,1 mm. La température de la colonne a été maintenue à 50°C et le volume de l'extrait de mycotoxines injectés a été de 50 µL. La phase mobile A contenait 99,5 % d'eau et 0,5 % d'acide acétique, et la phase mobile B contenait 99,5 % d'isopropanol et 0,5 % d'acide acétique.

Le programme de gradient utilisé a été : 90 % A (0,01 min), 45 % A (1,5 min), 15 % A (3,5 min), 20 % A (4 min), 98 % A (4,01 min), et enfin 98 % A (11 min). Le débit était de 0,4 ml/min.

- ✓ Les conditions du spectromètre de masse (MS/MS) :

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode d'ionisation par électrospray (ESI) avec une ionisation positive (ESI+) et négative (ESI-). Deux transitions de surveillance des réactions multiples (MRM) pour chaque analyte ont été surveillées pour la quantification (Q) et la qualification (q). Les paramètres du spectromètre de masse ont été : 250 °C ; bloc chauffant : 400 °C ; gaz de nébulisation : 2,5 L/min ; gaz de séchage : 15 L/min ; pression du gaz CID : 270 kPa (argon). Les paramètres analytiques pour l'analyse des mycotoxines par UHPLC-MS/MS sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7: Les paramètres analytiques pour l'analyse multi-mycotoxines des échantillons de blé

Mycotoxines	LOD µg/kg	LOQ µg/kg	MRM Q	Energie de collision - MRM Q	Polarité	R^2 Courbe de calibration	MRM QUAL	Energie de collision - MRM q
AFB1	1.0	3	313.2>241.05	-36	+	0.9992	313.2>285.1	-26
AFG1	1.0	3	329.1>242.9	-29	+	0.9998	329.1>200.0	-24
AFB2	1.5	4.5	315.1>259.0	-30	+	0.9997	315.1>286.9	-21
AFG2	1.5	4.5	331.2>189.05	-35	+	0.993	331.2>245,0	-35
OTA	0.5	1.5	404.0>238.9	-26	+	0,8750	404.0>358.0	-16
FB1	1.0	3	722.3>334.4	-43	+	0.9996	722.3>352.4	-44
FB2	3	9	706.2>318.4	-37	+	0.9980	706.2>336.4	-44
DON	5	15	355.1>59.0	35	-	0,9506	355.1>265.1	35
ZEN	0.5	1.5	317.1>175.2	25	-	0,9733	317.1>131.0	30
T2	5	15	484.0>215.1	-19	+	0.9904	484.0>305.2	-14
HT2	5	15	447.2>345.2	-18	+	0.9961	447.2>285.1	-21
CIT	0.5	1.5	355.0>175.10	-24	+	0.9988	355.0>247.1	-24
FUS-X	5	15	355.0>175.10	-19	+	0.9967	355.0>247.1	-12

Mycotoxines	LOD µg/kg	LOQ µg/kg	MRM Q	Energie de collision - MRM Q	Polarité	R^2 Courbe de calibration	MRM QUAL	Energie de collision - MRM q
NEO	5	15	400.2>185.1	-22	+	0.9967	400.2>215.1	-16
NIV	5	15	371.0>281.1	17	-	0.9992	371.0>311.2	12
3ADON	5	15	397.2>59.0	25	-	0.9901	397.2>307.1	16
15ADON	5	15	338.9>137.1	-19	+	0.9900	338.9>297.2	-14
BEA	0.5	1.5	784.0>244.1	-35	+	0.9935	784.4>262.1	-35
ENA	3	9	682.5>210.0	-25	+	0.9874	682.5>228.0	-39
ENA1	2	6	668.5>100.1	-30	+	0.9928	668.5>210.0	-12
ENB	0.5	1.5	640.4>196.0	-24	+	0.9921	640.4>520.6	-40
ENB1	2	6	654.50>196.0	-25	+	0.9975	654.5>57.1	-36

Les taux de récupération ont été déterminés par la fortification d'un échantillon non contaminé. Un échantillon de blé broyé (5 g), testé initialement négatifs a été enrichi avec différentes concentrations de mycotoxines avant l'extraction. Pour toutes les mycotoxines analysées, les taux de récupération étaient supérieurs à 88 %.

Les courbes d'étalonnage ont été construites avec au moins cinq niveaux de solutions étalons pour chaque mycotoxine analysée.

Les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ) ont été déterminées à partir d'échantillons blancs avec un rapport signal-bruit de 3 et 10, respectivement.

I.5. Estimation de l'apport quotidien en mycotoxine dans les échantillons de blé et le facteur de risque sur le consommateur tunisien

L'apport quotidien probable en aliments (PDI) a été utilisé pour évaluer l'exposition alimentaire de la population tunisienne aux mycotoxines. Il combine la teneur en mycotoxine contenant dans les échantillons de blé analysés avec la consommation de blé d'un adulte de la population tunisienne ayant un poids corporel de 70 kg (Juan et al., 2017).

Chaque PDI (ng/kg de poids corporel /jour) a été estimée à l'aide de la formule suivante (Juan et al., 2017) :

$$PDI = (A*B) / W$$

Avec :

A : la concentration moyenne de mycotoxine dans les échantillons analysés (µg/kg)

B : la consommation quotidienne de blé (g/jour)

W : le poids corporel moyen (pc) de la population adulte.

II. Étude in vitro

II.1. Interaction LAB (LP et LB) / mycotoxines (AFB1, AFM1, OTA et ZEN) en fonctions de différents facteurs

Les deux souches LAB, LP et LB, ont été testées in vitro pour déterminer leur capacité à éliminer l'AFB1 (20 µg/ml), l'AFM1 (20 µg/ml), l'OTA (20 µg/ml) et le ZEN (40 µg/ml) dans diverses conditions de culture : temps (0, 6 et 24h) et état du LAB (cellules viables et cellules non viables, traitées au HCL/chauffées pendant 15 min à 90 °C). De plus, les paramètres suivants ont été testés un par un : enrichissement en co-facteurs (CaCl2 (1M); NaCl (1M); MgCl2 (1M), pH (3.5; 4.5; 5.5; 6.5 et 7.5) et concentration bactérienne (10^7;10^8;10^9;10^{10} et 10^{11}

UFC/ml) pour les couples LP/AFB1(20 µg/ml) et LP/AFM1(20 µg/ml) ainsi que le LB/OTA (20 µg/ml) et le LB/ZEN (40 µg/ml).

II.2. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction du temps d'incubation

Différents volumes de la culture préparée ont été centrifugés (2500 rpm / 15 min) et les cellules bactériennes (bactéries viables 10^{10} UFC/ml) ont été lavés 3 fois par le PBS. Ensuite les cellules ont été suspendues avec 2 ml PBS contaminé avec de l'AFB1, AFM1, OTA ou ZEN. Les tubes ont été bien agités pendant 1 min à l'aide d'un vortex.et les suspensions bactériennes ont été incubées à 37 °C pendant 0, 6 et 24h. Des contrôles positifs d'AFB1, AFM1, OTA et ZEN dans le PBS (en absence de la bactérie) et des contrôles négatifs (Bactéries uniquement dans le PBS) étaient également incubés en même temps pour surveiller l'efficacité et la capacité de ces bactéries lactiques ; LP et LB à fixer les mycotoxines étudiées. Tous les tubes ont été centrifugés pendant 15 min à 2500 rpm à la fin de la période d'incubation. Les surnageants ont été, ensuite, collectés et transférés dans de nouveaux tubes. Les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'à la quantification de l'AFB1, de l'AFM1, de OTA et de la ZEN. Les mycotoxines libres contenues dans le surnageant étaient quantifiées par ELISA. Ce protocole est optimisé selon le protocole utilisé par Abbès et al. (2013).

II.3. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de l'état des bactéries (viables/non viables)

Pour étudier le pouvoir d'élimination à l'état viable et non viable, des volumes de la culture préparée ont été centrifugés (2500 rpm / 15 min) et les culots bactériens (bactéries viables 10^{10} UFC/ml) ont été suspendus par 2 ml PBS contaminé avec de l'AFB1, l'AFM1, la ZEN ou l'OTA. Des contrôles positifs d'AFB1, AFM1, OTA et ZEN dans le PBS (en absence de la bactérie) et des contrôles négatifs (Bactéries uniquement dans le PBS) étaient également incubés en même temps à pH=7.3. Les tubes ont été bien agités pendant 1 min à l'aide d'un vortex. Après incubation (24 h), tous les tubes ont été centrifugés pendant 15 min à 2500 rpm. Les surnageants ont été, ensuite, collectés et transférés dans de nouveaux tubes. Les tubes ont été conservés à 4°C jusqu'à la quantification de l'AFB1, de l'AFM1, de OTA et de la ZEN. Les mycotoxines libres contenues dans le surnageant étaient quantifiées par ELISA.

Pour déterminer l'effet d'adhésion ou de métabolisation de la bactérie sur les 4 mycotoxines, des volumes de la culture bactérienne (2 ml) ont été chauffés à 90°C pendant 15 min. Deux contrôles négatifs (Bactéries tuées par HCL et par chauffage) étaient également incubés en même temps. Tous les tubes ont été centrifugés pendant 15 min à 2500 rpm à la fin

de la période d'incubation. Les surnageants ont été, ensuite, collectés et transférés dans de nouveaux tubes. Après 24h incubation à 37 °C, on prend une aliquote de 200 µl pour la quantification de ces mycotoxines par ELISA.

II.4. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de la concentrations bactériennes

Différents volumes de la culture préparée ont été centrifugés (2500 rpm / 15min) et les cellules bactériennes (bactéries viables 10^7; 10^8; 10^9; 10^{10} et 10^{11} UFC/ml) ont été suspendues par 2 ml PBS contaminé avec de l'AFB1 ou l'AFM1 ou ZEN ou OTA. Les tubes ont été bien agités pendant 1 min à l'aide d'un vortex. Ensuite, les suspensions bactériennes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Des contrôles positifs d'AFB1, AFM1, OTA et ZEN dans le PBS (en absence de la bactérie) et des contrôles négatifs (Bactéries uniquement dans le PBS) étaient également incubés en même temps à pH=7.3. Ensuite, chaque culture a été centrifugée à 2500 rpm pendant 15 min, puis, les surnageants sont collectés dans de nouveaux tubes dans le but de déterminer la quantité résiduelle de ces mycotoxines par la méthode ELISA.

II.5. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction du pH du milieu

Différents volumes de la culture préparée ont été centrifugés (2500 rpm, 15min) et les cellules bactériennes de LP (bactéries viables 10^{10} UFC/ml) ont été suspendues par 2 ml de PBS avec différents pH (3.5 ; 4.5 ; 5.5 ; 6.5 et 7.5) contaminé avec de l'AFB1 ou de l'AFM1 et la culture de LB (10^{10} UFC/ml) contaminée avec de l'OTA ou ZEN. L'ajustement de pH a été fait par des solutions HCL 0,1M et NaOH 0,5M. Les tubes ont été bien agités pendant 1 min à l'aide d'un vortex puis incubés pendant 24 h à 37 °C. A la fin de la période d'incubation, chaque culture a été centrifugée à 2500 rpm / 15 min, puis, les surnageants ont été collectés dans de nouveaux tubes dans le but de quantifier ces mycotoxines par la méthode ELISA.

II.6. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de la présence des cofacteurs (NaCl, $MgCl_2$ et $CaCl_2$)

Différents volumes des cultures préparées précédemment, ont été centrifugés (2500 rpm / 15 min) et les cellules bactériennes (bactéries viables 10^{10} UFC/ml) ont été suspendues par 2 ml de PBS contaminé avec de l'AFB1, l'AFM1, l'OTA ou la ZEN. Ensuite, une des solutions suivantes : NaCl 1M ; CaCl2 1M ou MgCl2 1M a été ajouté à chaque fois, d'une manière indépendante. Les tubes ont été bien agités pendant 1 min à l'aide d'un vortex, puis, mis en incubation pendant 6 h à 37 °C. À la fin de la période d'incubation, chaque culture

a été centrifugée à 2500 rpm / 15 min, puis, les surnageants ont été collectés dans de nouveaux tubes dans le but de quantifier ces mycotoxines par la méthode ELISA.

II.7. Interaction LAB (LP, LB et LR) / mycotoxine (ENB) en fonction de plusieurs facteurs

L'objectif de ce travail a été d'évaluer la capacité de trois souches de bactéries lactiques, LP, LB et LR à réduire la teneur en ENB dans différentes conditions du milieu de culture (pH et viabilité cellulaire). Les expériences ont été réalisées en utilisant un tampon CPB 0.1M ajusté à deux pH différents (3.5 et 7.5) et en ajoutant de l'ENB (50 ng/ml, basée sur les teneurs en ENB quantifiées dans les échantillons de blé collectés) et une concentration de 10^{10} UFC/ml en LAB viables et non viables (LAB traitées thermiquement à 90°C pendant 15 min). Des contrôles positifs (ENB dans le CPB) et négatifs (LAB dans le CPB) ont également été incubés.

Le mélange a été incubé à 37°C pendant 1 h avec agitation et 23 h sans agitation. Après centrifugation, la quantité de l'ENB libre dans le surnageant a été quantifiée par UHPLC-MS/MS afin de déduire la quantité séquestrée par les LAB et déterminer le pourcentage d'adsorption/absorption de toxine.

III. Détermination de la CI50 de la bentonite et de L. plantarum MON03 sur plusieurs lignées cellulaires

III.1. Principe

Depuis sa découverte par Mosmann 1983, le MTT (bromure de 3(4,5-dimméthylthiazole-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium) est la technique *in vitro* la plus utilisée pour déterminer la concentration inhibitrice de 50 % (CI_{50}). Cette technique détermine l'habilité des cellules vivantes à convertir la coloration jaune de sel tétrazolium MTT à des cristaux violets insolubles de formazan par les enzymes mitochondriaux (déshydrogénases). La technique MTT est très utilisée pour déterminer la viabilité ou l'activité métabolique des cellules de mammifères, car elle est rapide, polyvalente, quantitative et reproductible (Ciapetti et al., 1993; Hanelt et al., 1994). En effet, la déshydrogénase, une enzyme clé dans le cycle de Krebs, catalyse la conversion du succinate en fumarate. La réduction de MTT sera utilisée pour mesurer l'activité de cet enzyme, une flavoprotéine qui est fréquemment liée à la membrane interne mitochondriale. Par spectrophotométrie, il est faisable de déterminer l'effet toxique sur une population cellulaire donnée, l'absorption est proportionnelle à l'activité du succinate-déshydrogénase, qui est proportionnelle au degré de toxicité cellulaire. Le pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules témoins est utilisé pour calculer l'effet cytotoxique des molécules.

III.2. Mode opératoire

Les cellules Véro, Caco-2, C5-O, HepG2 et les leucocytes humains sont utilisés pour évaluer la relation dose-réponse en présence de deux bio-produits (BT et LP). Les cellules monocouches en phase exponentielle de croissance ont été récoltées de leurs boites à l'aide de la trypsine 0.25%. Les suspensions cellulaires ont été réglées à des densités de 1×10^4 à 5×10^5 cellules par 500µl de milieu par puits. Les Caco-2, les C5-O et les HepG2 ont été utilisées à une concentration de 1×10^4 cellules. Les cellules Véro et les leucocytes ont été utilisées à une concentration de 5×10^5 cellules. Les cellules ont été ensuite ensemencées dans des plaques multipuits puis incubées pendant 24 h à 37 °C dans une atmosphère humide à 5 % de CO2. La BT et la LP ont été ajoutées dans 100 µl de milieu avec des concentrations allant de 1×10-3 jusqu'à 7 mg/ml pour la BT et de 103 jusqu'au 1011 UFC/ml de LP.

À partir de la solution MTT acheté (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) une solution de concentration 5 mg/ml a été préparée dans du PBS (Sigma, St Louis, MO, USA). La solution est filtrée à 0,22 µm puis conservée à +4°C. Après 48h d'incubation à 37°C, les milieux contenants la LP et BT ainsi que les témoins ont été enlevées et les tapis cellulaires ont été rincés 3 fois avec du PBS. 100µl de la solution MTT a été ajouté dans chaque puit et l'ensemble a été incubé de 3 à 4h à 37°C. Ensuite, les solutions de MTT ont été éliminées, et les cristaux de formazan insolubles formés ont été dissous à raison de 1 ml/puits dans une solution de lyse (0.04 M HCl/isopropanol). Le mélange a été incubé à 37 °C pendant 2 h dans une atmosphère à 5 % de CO2. Enfin, l'absorbance est mesurée avec un lecteur de microplaques à 540 nm (Tecan Sunrise Absorbance Microplate Reader, Pheonix, CA), et le pourcentage de viabilité des cellules à chaque concentration est déterminé par rapport au solvant.

La CI_{50} de chaque lignée cellulaire en fonction des concentrations de BT et de LP a été déterminée à partir d'une courbe : concentration de chaque adsorbant = f (pourcentage de viabilité). Chaque exposition a été répétée 3 fois dans le but de déterminer la sensibilité de chaque type cellulaire vis-à-vis de LP et BT utilisées et pour faciliter la tâche pour d'autres études toxicologiques utilisant ces modèles cellulaires.

IV. Évaluation de la toxicité et de l'effet préventif de la BT et de la LP contre l'AFB1 et la ZEN inductrices de la fragmentation d'ADN et de l'apoptose sur les cellules Caco-2

IV.1. Culture cellulaire et traitement

Dans un milieu RPMI 1640, une concentration de 1×10^4 cellules Caco-2 par ml ont été préparées à partir des cellules monocouches en phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été ensemencées dans des boîtes de 25 cm2 à raison de 5 ml de milieu par flasque. Après

une incubation de 24 h à 37 °C dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2, les cellules ont été traitées de la manière suivante :

Groupe A :

A1 : Cellules Caco-2 + éthanol/eau

A2 : Cellules Caco-2 + 40 µM de ZEN

A3 : Cellules Caco-2 + 40 µM de ZEN + 10^3 UFC/ml de LP

A4 : Cellules Caco-2 + 40 µM de ZEN + 0,5 mg/ml de BT

A5 : Cellules Caco-2 + 40 µM de ZEN + 0,5 mg/ml de BT +10^3 UFC/ml de LP

Groupe B :

B1 : Cellules Caco-2 + éthanol/eau

B2 : Cellules Caco-2 + 100 nM d'AFB1

B3 : Cellules Caco-2 + 100 nM d'AFB1+ 0,5 mg/ml de BT

B4 : Cellules Caco-2 + 100 nM d'AFB1+ 10^3 UFC/ml de LP

B5 : Cellules Caco-2 + 100 nM d'AFB1+ 0,5 mg/ml de BT ++10^3 UFC/ml de LP

Les concentrations choisies sont selon (Abid-Essefi et al., 2003 ; Abbès et al., 2008; Belgacem et al., 2019; Ben Salah-Abbès et al., 2020). Les cultures ont été ensuite incubées, pendant 24h, à 37°C (5% CO_2-95% air) et la culture a été fait en trois exemplaires.

IV.2. Extraction et purification de l'ADN

Deux ml de solution de lyse (Tris-HCl, pH 8, 20 mM-EDTA 5 mM-Sarcosyl 1%) ont été ajoutés dans les boites de culture. Le lysa a été transféré dans des tubes de 15 ml. Deux ml de solution de lyse (Tris-HCl, pH 8, 20 mM-EDTA 5 mM-Sarcosyl 1%) ont été ajoutés dans les boites de culture. Le lysa a été transféré dans des tubes de 15 ml. La digestion des protéines a été effectuée avec 10 µl de protéinase K (20 mg/ml) pendant une nuit à 37°C. L'extraction a été poursuivie par addition de 3,3 ml d'un mélange phénol/chloroforme (2/1 : v/v) en présence de 1,3 ml d'acétate d'ammonium 7,5 M sous agitation pendant 20 min. Ensuite l'extrait a été centrifugé à 2200 g pendant 5 min à 20°C, la phase organique a été éliminée et la phase aqueuse a subi une deuxième extraction par addition de 3,3 ml de SEVAG (chloroforme/alcool isoamylique, 24/1, v/v) suivie par une centrifugation à 2200 g / 5 min / 20°C. La phase aqueuse contenant les deux types d'acide nucléique (ADN et ARN) a été recueillie et a été mis à l'étuve à 37°C pendant 5 min pour éliminer les traces restantes de chloroforme, les ARNs ont été ensuite hydrolysés en présence de 16 µl de RNase A (1 mg/ml) pendant 30 min à 37°C en assurant une agitation toute les 5 min. 2,7 ml de SEVAG ont été par la suite ajoutés pour éliminer les ARNs. Après centrifugation à 2200 g pendant 5 min à 37°C, l'ADN contenu dans

la phase aqueuse a été précipité en présence de 5 ml d'éthanol absolu froid pendant 2h à -20°C. Après une dernière centrifugation à 2200 g pendant 45 min à 4°C, le culot contenant l'ADN pur a été rincé à l'éthanol 70%, a été séché à l'air libre, a été solubilisé dans 200 µl de Tris-EDTA (20 : 1) puis il a été conservé à -20°C.

IV.3. Quantification de l'ADN

Le rendement de l'extraction de l'ADN ainsi que sa pureté ont été appréciés par spectrophotomètre. Des spectres d'absorption en lumière ultraviolette ont été réalisés entre 220 et 300 nm. Le rapport de densité optique a été utilisé pour déterminer la pureté (DO280 nm), un rapport acceptable devrait être compris entre 1,88 et 2. Le DO à 260 nm a été utilisé pour calculer la concentration en acide nucléique, puisqu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à environ 50 µg d'ADN/ml de solution. La DO à 280 nm renseigne sur la concentration en protéine et sur une éventuelle contamination de l'ADN extraite par les protéines.

IV.4. Évaluation de la fragmentation d'ADN par la technique à la diphénylamine

IV.4.1. Principe

L'évaluation de la fragmentation de l'ADN a été effectuée selon la méthode décrite par BURTON (1956). Cette technique est basée sur le fait que l'ADN fragmenté peut être séparé de l'ADN chromosomique par centrifugation. Après lyse des cellules et libération de l'ADN nucléaire, l'étape de centrifugation génère deux fractions correspondant l'une à l'ADN intact et l'autre à l'ADN fragmenté. Les fragments d'ADN produits, ont été recherchés et identifiés dans le surnageant grâce à la diphénylamine qui interagit avec les désoxyriboses des bases puriques de l'ADN en développant une coloration bleue dont l'intensité peut être appréciée par absorbance à 600 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de fragments d'ADN déterminé comme suite :

% fragmentation d'ADN = (% de fragmentation dans le surnageant / (% de fragmentation dans le surnageant + % de fragmentation dans le culot).

IV.4.2. Mode opératoire

Après 24h d'incubation les cellules intoxiquées ont été récupérées par trypsinisation et centrifugées à 1800 RPM à +4°C pendant 10 min dans des tubes nommés (B). 1 ml de la solution TTE (tampon tris- HCI 10mm, EDTA 1mm, 0,2% Triton X-100) a été ajouté aux tubes (B). Les tubes ont été ensuite centrifugés et les surnageants ont été récupérés dans des nouveaux tubes (T). Un ml de la solution de TTE a été ajouté aux tubes (B). 1 ml d'acide trichloracétique

25% a été ajouté aux tubes (T) et (B) et on laisse précipiter pendant une nuit à +4°C. L'ADN précipité a été recentrifugé à 5000 pendant 10 min à +4°C. Les surnageants ont été éliminés et l'ADN a été précipité en ajoutant 160 µl de TCA 5% à chaque culot et en chauffant 15 min à 90°C. 320 µl de la solution de diphénylamine fraîchement préparée (150 mg diphénylamine dans 10 ml d'acide acétique glacial, 150 µl d'acide sulfurique concentré, 50 µl d'acétaldéhyde 1,6 mg/ml) a été ajouté à chaque tube. L'ensemble a été incubé pendant une nuit à température ambiante. La lecture de DO a été effectuée à 600 nm. Le pourcentage de l'ADN fragmenté est donné par la formule suivante :

% ADN fragmenté = (T/T+B*100)

Avec :

T : % de fragmentation dans le surnageant

B : % de fragmentation dans le culot

IV.5. Mise en évidence de l'induction de l'apoptose par mesure de l'activité caspase-3

IV.5.1. Principe

C'est un test colorimétrique qui mesure l'activité de la caspase-3, une protéase spécifique à la cystéine, acide aspartique. Cette enzyme produit une séquence tétrapeptidique spécifique acétylée DEVD (Asp-Glu-Val-Asp). Le chromophore para-nitroaniline (pNA) est associée à cette séquence (ADNp). L'action de la caspase sur une telle structure est de cliver et libèrer l'ADNp, qui a une coloration jaune à 405 nm et dont l'intensité est proportionnelle à l'activité caspase-3 (DEVDase) (Thornberry et al., 1992). Cette activité est calculée par rapport à un étalonnage avec un étalon pNA. En présence de l'inhibiteur de caspase Z-VAD-FMK, la séquence DEVD est bloquée et la caspase ne peut pas cliver. L'activité de caspase dans l'échantillon est mesurée par l'intensité de la couleur jaune en l'absence et en présence d'un inhibiteur de caspase.

IV.5.2. Traitement des cellules

L'activité caspase-3 a été testée chez les cellules Caco-2. Les cellules ont été récupérées après 24h d'incubation à 37°C, en atmosphère enrichie avec 5% de CO_2. Les cellules intoxiquées par les mycotoxines et les deux types de bio-produits (BT et LP) sont en présence ou en absence d'inhibiteur de caspase (Z-VAD-FMK) (50 µM). Des cellules non traitées ni par les toxines, ni par les bio-produits, ni par l'inhibiteur de caspase serviront de témoins négatifs. Les cellules correspondant à tous ces traitements ont été ensuite incubées pendant 24 heures, à 37°C en atmosphère 5% CO_2 (95% air).

IV.5.3. Mesure de l'activité caspase-3

Après incubation, les cellules Caco-2 récupérées ont été centrifugées, 150 µl de tampon de lyse ont été ajoutés au culot, et les cellules ont été lysées par un choc thermique (alternance de congélation/décongélation) suivi d'une centrifugation de 20 min à 15000 g à 4 °C. Le lysat a été récupéré et aliquoté pour la mesure de l'activité caspase-3. La réaction a été effectuée dans des puits d'une plaque de 96 puits utilisant des échantillons contenant environ 50 g de protéines en présence du substrat (Ac-DEVD-pNA) et du tampon caspase dans un volume total de 100 µl. La plaque a été lue à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque après 4 h d'incubation à 37 °C. l'activité caspase-3 a été déterminée par rapport à un étalonnage et en utilisant un protocole de calcul proposé par le fournisseur du kit de dosage (Thornberry et al., 1992)

V. Étude *in vivo* : Évaluation *in vivo* du pouvoir de détoxification des mycotoxines (AFM1, AFB1 et ZEN) par les LAB et/ou l'argile (bentonite)

V.1. Évaluation du pouvoir préventif de *Lactobacillus rhamnosus* GAF06 (LR), de bentonite (BT) et de mélange LR/BT vis-à-vis de la toxicité de l'AFM1

Le principe de cette étude repose sur l'administration orale, par gavage dans le PBS (véhicule) pendant 10 jours à des souris qui ont été initialement organisés en sept groupes de traitement (8 souris/groupe). Les concentrations de l'AFM1, de BT et de LR choisies sont selon Abbès et al. (2012b, 2013).

- Groupe 1 : témoin
- Groupe 2 : recevant 200 µl de la solution bactérienne (2.10^8 UFC/ml)
- Groupe 3 : recevant 200 µl de la solution argile (1 g / l)
- Groupe 4 : recevant 200 µl de la solution AFM_1 (100 µg/Kg p.c)
- Groupe 5 : recevant 200 µl de la solution AFM_1 (100 µg/Kg p.c) et 200 µl de la solution bactérienne (2.10^8 UFC/ml)
- Groupe 6 : recevant 200 µl de la solution AFM_1 (100 µg/Kg p.c) et recevant 200 µl de la solution argile (1g / l.)
- Groupe 7 : recevant 200 µl de la solution AFM_1 (100 µg/Kg p.c), 200 µl de la solution bactérienne (2.10^8 UFC/ml) et recevant 200 µl de la solution argile (1g/L)

V.1.1. Étude de la toxicité générale

Cette étude consiste à suivre le comportement des animaux après traitement et évaluer le taux de mortalité s'il existe ainsi que l'évaluation du poids corporel et la consommation de nourriture aussi bien pour les souris traitées que pour les témoins.

Avant toute manipulation l'ensemble des souris a été pesé afin d'en déterminer le poids corporel moyen. Après 10 jours du traitement nous avons procédé à une évaluation du poids pour les souris traitées et les témoins.

Le test de refus de repas consiste à suivre la consommation en nourriture des souris tout au long de la période du traitement selon la formule ci-dessous :

$$C = Qi - Qr$$

Avec :

C : consommation

QI : quantité initiale (g)

QR : quantité restante après 24 h de chaque traitement en (g)

V.1.2. Étude des paramètres biochimiques

Le sang collecté dans des tubes héparines sert à la détermination des paramètres biochimiques : le cholestérol (Chl), l'acide urique (AU) et l'albumine (alb) à l'aide d'un compteur de paramètres biochimiques (C×9 PRO. BECKMAN).

V.1.3. Détermination de statut oxydant/antioxydant au niveau du foie et du rein

V.1.3.1. Préparation de l'extrait brut

Les foies et les reins destinés aux dosages biochimiques ont été homogénéisés à froid avec un Potter dans un tampon de phosphate de potassium (K2HPO4 100 mM, PH= 8,2) pour les dosages d'activité du superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT), ainsi que les dosages de protéines thiol (PSH) et malonaldéhyde (MDA). Le broyat a été centrifugé pendant 20 min à 4 °C à 14500 rpm. Ensuite, le surnageant est récupéré et conservé à -80 °C pour les différents dosages.

V.1.3.2. Dosage des protéines totales

Ce dosage est utilisé pour normaliser les résultats des dosages biochimiques qui sont basés sur la quantité totale de protéines dans les échantillons. La méthode de Bradford a été utilisée pour déterminer la concentration totale en protéines (Bradford 1976). Toutes les concentrations sont exprimées en milligrammes de protéines.

- ✓ Principe de la méthode

Il s'agit d'une méthode de mesure de la concentration en protéines fondée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant, le bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge brunâtre à l'état libre, devient bleu lorsqu'il est lié aux protéines. En conséquence, l'intensité de la coloration varie proportionnellement à la quantité de protéines dans chaque échantillon. Le bleu de Coomassie a un coefficient d'extinction molaire visible élevé (à 595 nm), permettant un dosage très précis. La teneur en protéines des échantillons a été étalonnée à l'aide d'une solution d'albumine bovine sérique (BSA).

✓ Protocole

Un volume déterminé d'homogénat (20 µl) dilué (10*) a été placé dans l'obscurité pendant 5 min avec le réactif Bradford (2 ml) et 180 µl d'eau distillée. Un spectrophotomètre a ensuite été utilisé pour mesurer l'absorbance à 595 nm. Une solution d'albumine bovine a été utilisée pour tracer la courbe d'étalonnage (BSA) (Figure 9).

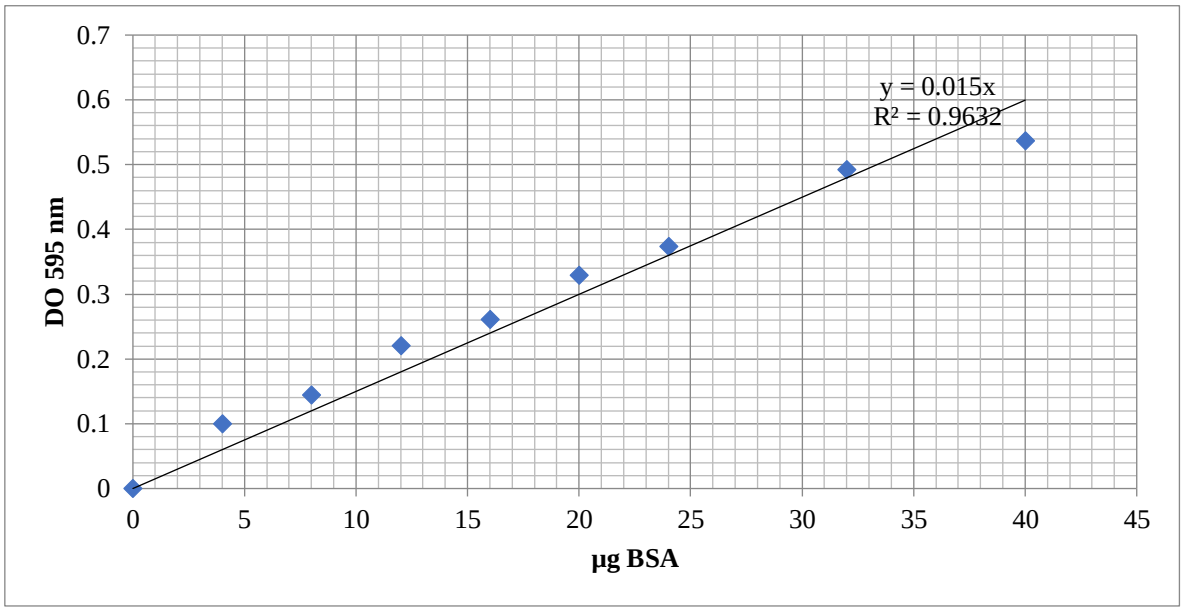


Figure 9: Courbe d'étalonnage pour le dosage de protéines totale.

V.1.3.3. Dosage de l'activité du superoxyde dismutase

✓ Principe

La mesure de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) a été déterminée à l'aide de la méthode de Marklund et Marklund (1974). Elle est basée sur l'effet inhibiteur du SOD sur l'auto-oxydation du pyrogallole en présence d'O2 (Figure 10). Dans les conditions de dosage, une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité capable d'inhiber 50 % de l'auto-oxydation du pyrogallole.

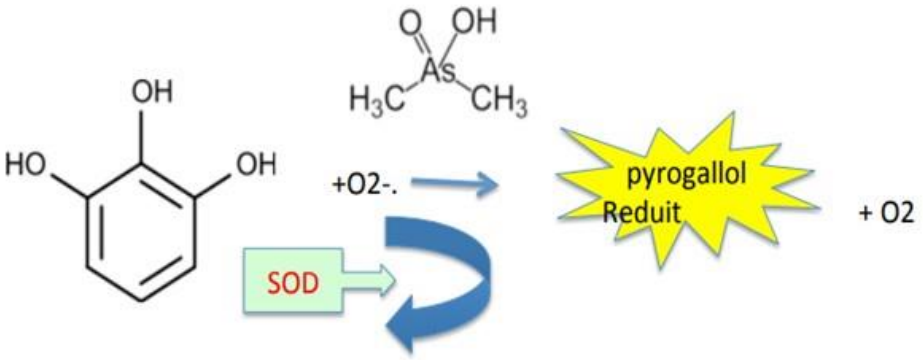


Figure 10: Principe de dosage de l'activité SOD.

✓ Protocole de dosage

- Préparation des échantillons

Dans un tube en verre, 250 µl d'échantillon ont été mis en présence de 100 µl d'éthanol et de 100 µl de chloroforme froid. Le mélange a ensuite été centrifugé à 4 °C pendant 25 min à 3600 rpm. La phase organique a été récupérée (surnageant), et l'échantillon est prêt à être dosé.

- Détermination de l'absorbance maximale

Dans une cuve en verre, 940 µl de la solution tampon, 20 µl du tampon et 40 µl du pyrogallol ont été mis en ordre.

Après l'ajout de pyrogallol, le chronomètre a été déclenché à 45 sec, et le contenu a été doucement homogénéisé par retournement. Après les 45 sec, la variation d'absorbance a été mesurée toutes les 10 secondes à 420 nm sur un intervalle d'une minute. Cette absorbance maximale correspond à une inhibition de 0 %.

- Détermination de l'absorbance des échantillons

Les mêmes étapes de la détermination de l'absorbance maximale ont été réalisées, sauf qu'à la place de 20 µl de la solution tampon, nous avons mis 20 µl de l'échantillon afin de déterminer leur absorbance.

✓ Calcul de l'activité du SOD

L'activité de cette enzyme a été déterminée selon cette formule :

Activité de la SOD = {(% inhibition × facteur de dilution) × (Volume final/volume de la prise d'essai)} / Qunatité de proteines totales

Avec :

% inhibition = [(A blanc- A échantillon/ A blanc) * 100] /50.

A blanc : variation de l'absorbance pendant une minute pour l'essai du blanc (constante).

A échantillon : variation de l'absorbance pendant une minute pour l'essai de l'échantillon

Volume de la prise d'essai : 20µl

Volume final : 1000 µl

V.1.3.4. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

✓ Principe

Les catalases aident les cellules à se défendre contre le stress oxydatif en éliminant les espèces réactives d'oxygène (ROS) et en accélérant la dismutation spontanée du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est toxique pour les cellules (Figure 11).

La technique utilisée est décrite par Aebi (1984), et elle est basée sur une surveillance en UV à 240 nm de la dégradation du peroxyde d'hydrogène par l'enzyme selon la réaction suivante :

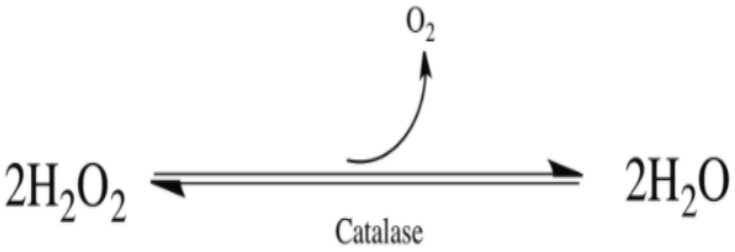


Figure 11: Principe de dosage de l'activité CAT.

✓ Protocole de dosage

Dans une cuve en quartz, 940 µl du tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4, 100 mM, pH 7), 50 µl de H_2O_2 et 10 µl d'échantillon ont été mis. La diminution de la densité optique (240 nm) a été suivie à un intervalle de 5 sec pendant 30 sec.

La quantité d'enzyme nécessaire pour convertir un µmol de H_2O_2 en une seconde est définie comme une unité (U) d'activité enzymatique.

✓ Mesure de l'activité enzymatique

Comme indiqué précédemment, la mesure a été prise à 240 nm. Les résultats de l'activité ont été exprimés en micromoles de peroxyde d'hydrogène consommé par minute et par mg de protéines, et l'activité est donnée par la formule suivante :

Activité du catalase (µmol H_2O_2/min/mg de protéine) = Δ DO × FD/ E×L×X

Avec

FD : Facteur de dilution.

ε : Coefficient d'extinction (= 0.043 $mM^{-1}.cm^{-1}$).

L : La longueur de la cuve utilisée (1 cm).

X : La quantité des protéines mg/ml.

V.1.3.5. Dosage des teneurs en malondialdéhyde (MDA)

✓ Principe du dosage

La méthodes de l'acide thiobarbiturique (TBA) a été utilisé pour le dosage de MDA)(Yagi 1976). Cette méthode consiste à faire réagir les fonctions aldéhydes libérées à 100 °C par hydrolyse acide (acide perchlorique) pour former un complexe MDA-TBA (couleur rouge-rose) quantifiables à 535 nm par spectrophotométrie.

✓ Protocole

Un volume d'échantillon (100 µl) a été mélangé avec 2 ml du TBA (0,67%), et 800 µl TCA (20 %)**.** Le mélange a été vortexé pendant 2 min puis incubé à 100°C pendant 30 min dans un bain-marie et refroidi pendant 10 min à l'eau froide. Enfin, une centrifugation du mélange à 4000 rpm/min à 4°C pendant 10 min a été réalisée. Après avoir pris doucement le surnageant, l'absorbance a été mesurée à 535 nm.

✓ Détermination des concentrations

Le taux d'accumulation du MDA a été calculé selon la formule suivante :

Taux d'accumulation du MDA = DO535 × FD / 1.56 × 1000 × Quantité de protéine totale

Avec :

FD : facteur de dilution

DO_{535} : Densité optique du MDA de chaque échantillon biologique, lue à 535 nm

V.1.3.6. Dosage de teneurs en protéines sulfhydriles (PSH)

✓ Principe

Le dommage oxydatif des protéines est marqué par la diminution des teneurs en protéines thiols (PSH). La Concentration en protéines sulfhydriles a été déterminée selon la méthode de Sedlak et Lindsay (1968**)** par la soustraction du contenu en protéines non

sulfhydriles du contenu total sulfhydrique après précipitation des protéines d'intérêt (PSH) par le TCA 5 %.

✓ Protocole

10 µl de l'homogénat ont été incubés, pendant 15 min et à température ambiante, en présence de 150 µl de Tris 0,2 M (pH=8,2), 40 µl EDTA 0,02 M, 790 µl de méthanol et 10 µl de DTNB 0,01 M, (dissous dans le méthanol). Ensuite, le mélange a été centrifugé pendant 10 min, à 14500 rpm à 4°C. L'absorbance a été lue à 412 nm contre un blanc ne contenant ni l'échantillon ni le DTNB et les échantillons ont été récupérés pour les étapes suivantes.

Après, 45 µl de TCA 5% ont été ajoutées aux échantillons récupérés afin de précipiter les protéines sulfhydriles. 300 µl du surnageant ont été additionnés avec 600µl Tris 0,4 M (pH=8,9) et 15µl de DTNB 0,01M. Le mélange a été incubé pendant 3 min à température ambiante. Enfin, l'absorbance a été lue à 412 nm.

✓ Préparation de la courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage a été établie à partir d'une solution mère du réactif GSH pour une gamme comprise entre 0 et 400 µg de GSH (Figure 12).

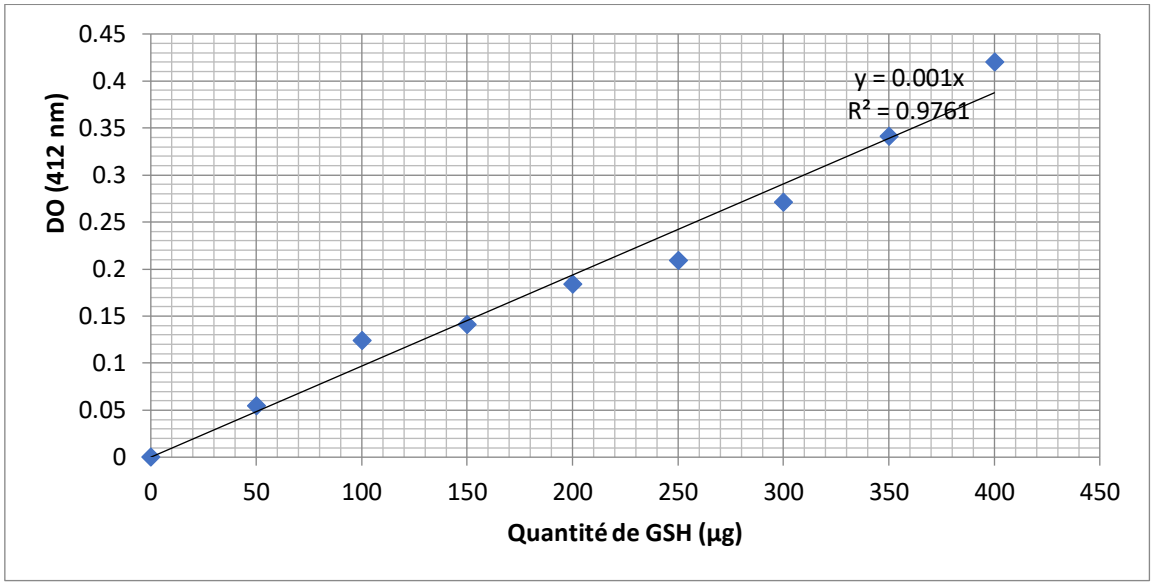


Figure 12 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des PSH (GSH : Glutathion réduit).

✓ Détermination des concentrations

Les concentrations en protéines thiols ont été calculées selon la formule suivante :

Taux de PSH (µg)/ mg de protéines = $(DO(1)_{412} – DO(2)_{412})$ / (pente de la gamme GSH×Quantité de protéines totales)

Avec :

DO $(1)_{412}$: Densité optique du contenu sulfhydrile total, lue à 412 nm

DO $(2)_{412}$: Densité optique du contenu non sulfhydrile, lue à 412 nm

Pente gamme GSH : 0,001

V.1.4. Mesure de l'index splénique et index thymique

L'index splénique et thymique ont été calculés selon les formules suivantes :

Index splénique = (poids de la rate en g/poids de l'animal en g) *100

Index thymique = (poids du thymus en g/poids de l'animal en g) */100

V.1.6. Etudes de la viabilité des splénocytes et des thymocytes

V.1.6.1. Isolement des splénocytes

La rate a été placée dans une boite de pétri 90 x 8 mm remplie de 1,5 ml de PBS et elle a été écrasée doucement avec une pince pour extraire les splénocytes. Ensuite, 750 µl de la solution cellulaire a été placé au fond d'un tube eppendorf, puis, 750 µl de la solution cellulaire a été ajouté doucement pour avoir deux phases séparées. Après centrifugation (10 min / 3300 rpm / -4°C), les cellules sanguines ont été trouvées vers le fond du tube tandis que les cellules lymphocytaires ont formé un anneau entre les deux phases. Ensuite, l'anneau lymphocytaires a été récupéré à l'aide d'une micropipette et les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS et elles ont été remises en suspension dans un volume connu (lavage + centrifugation à 3300 RPM pendant 10 min).

V.1.6.2. Préparation de la suspension de thymocytes

Le thymus a été déposé dans une boite de pétri 90 x 8 mm contenant 1,5 ml de PBS. Les thymocytes ont été dissociés par écrasement doux du thymus entre les mâchoires de pince. Les débris tissulaires ont été éliminés en filtrant la suspension sur gaze. Les cellules ont été ensuite centrifugées et lavées 3 fois avec le PBS puis remise en suspension dans le PBS.

V.1.6.3. Détermination de viabilité cellulaire à l'aide de bleu de trypan

- Principe de la méthode de bleu de trypan

Pour mettre en évidence la viabilité cellulaire, un test de bleu de Trypan a été adopté. Ce dernier est un colorant anionique qui se lie aux protéines cellulaires. Il a la capacité à entrer dans les cellules qu'il croise. Une fois à l'intérieur de la cellule, cette molécule est éjectée dans le milieu extérieur par un mécanisme d'exclusion. Seules les cellules dotées d'une source d'ATP peuvent activer ce mécanisme exigeant l'énergie. En conséquence, une cellule vivante expulse la molécule et apparaît blanche sous le microscope, tandis qu'une cellule morte n'a pas les moyens de l'expulser et reste bleue.

- Protocole

Pour effectuer le test de viabilité, la suspension cellulaire a été diluée dans PBS-Bleu trypan à 0,2 % puis le nombre des cellules a été évalué à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique (G x 40).

Le comptage a été fait selon la formule suivante :

N (cellules/mm^3) = n*v*d

Avec :

n = nombre de cellules comptées sur un grand carreau de la cellule de Thoma

v = inverse du volume d'un grand carreau qui est de 1/250 mm^3

d = facteur de dilution

V.1.7. Sous-types de cellules immunitaires et profil d'immunoglobuline

Les sous-types de cellules immunitaires ont été identifiés à l'aide des anticorps CD3+, CD4+, CD8+ et CD56+ (Kidlingtone, Oxford, UK). Le profil des immunoglobulines IgG et IgA a été mesuré par néphélométrie cinétique.

V.1.8. Étude histologique

Les organes destinés à l'étude histologique ont subi une série de traitement composé de 6 étapes successives : le prélèvement, la fixation, l'inclusion, la coupe, la coloration, et la conservation des coupes.

- Le prélèvement

Après 48 h du dernier jour du traitement, les souris ont été sacrifiées par translocation cervicale et les organes destinés à l'étude histologique (foie et rein) sont prélevés par autopsie.

- La fixation

Les organes ont été ensuite, placés immédiatement dans un volume de formol (10 %) de 30 à 40 fois le volume de l'organe pendant une semaine, afin d'immobiliser les structures cellulaires et tissulaires.

- L'inclusion

L'inclusion dans la paraffine est accomplie en infiltrant et en enrobant les tissus à examiner avec de la paraffine. Elle est précédée de deux étapes essentielles :

- ✓ La déshydratation

Elle a pour but d'éliminer le fixateur. En effet, les organes déjà fixés seront déshydratés par des bains d'alcool éthylique à concentration croissante.

- ❖ Rinçage 2 fois à l'alcool 70 % suivi d'un bain d'alcool 75 % de 1 h 30 min
- ❖ 2 bains successifs d'alcool 85 % de 1 h 30 min chacun
- ❖ 2 bains successifs d'alcool 95 % de 1 h 30 min chacun
- ❖ 2 bains successifs d'alcool absolu de 1 h 30 min chacun

- ✓ La désalcoolisation

Elle consiste à l'immersion des échantillons dans 2 bains successifs d'xylène de 1 heure chacun permettant de dissoudre les graisses et de rendre la pièce translucide. Au fur et à mesure de leur infiltration par le solvant, les tissus ont tendance à s'éclaircir. Les tissus ont été imprégner dans 2 bains de paraffine ; le premier est de 1 h dans une étuve réglée à 56 °C et le deuxième pendant une nuit sur la payasse.

- Montage des blocs

Le blocage de l'organe a été obtenu par solidification de la paraffine en coulant de la paraffine fondue dans des moules spécialisées dites "barres de Leukhart" puis marquage des blocs par des étiquettes portant des inscriptions permettant leurs identifications.

- La coupe

Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées et elles ont fait l'objet de coloration standard par l'hématoxyline-éosine (H&E).

- La coloration

Les colorants sont hydrophiles, tandis que la paraffine est hydrophobe. C'est pourquoi la coloration des coupes comprend une étape de déparaffinage et de réhydratation. Ceci est accompli par une série de bains, d'abord dans un solvant qui enlève la paraffine (xylène), puis dans une série d'alcools allant de 100% à 75%, et après la coupe est colorée.

Le principe de coloration repose sur l'affinité particulière de certains tissus ou constituants cellulaire pour un colorant bien déterminé. La coloration utilisée est l'hématoxyline/éosine : l'hématoxyline est une substance de base qui transforme les noyaux en violet et colore ainsi les acides nucléiques. L'éosine est une substance acide qui colore les protéines et ainsi le cytoplasme apparait coloré en rose.

- La conservation

Les coupes ont été montées entre lames et lamelles à l'aide d'Eukit et conservées à 37°C. Les préparations ont été observées au microscope optique.

V.1.9. Étude statistique

Les données statistiques ont été analysées par le test one-way ANOVA. Toutes les valeurs représentent la moyenne ± écart type et la différence est significative à $p \leq 0,05$.
Posthoc : Le test de Dunnett qui compare les moyennes des groupes expérimentaux à celles du contrôle pour déterminer s'il existe une différence.

V.2. Évaluation du pouvoir préventif de *Lactobacillus plantarum* MON03 (LP), de bentonite (BT) et de mélange LP/BT vis-à-vis de la toxicité de l'AFB1 et la ZEN

Dans cette étude, nous avons utilisé des souris mâles, Balb/c, provenant d'un élevage de l'animalerie du laboratoire (GBVB). Le principe de cette étude repose sur l'administration orale, par gavage dans le PBS pendant 20 jours à des souris qui ont été initialement organisées en 5 groupes de traitement (8 souris/groupe). Les concentrations choisies (Abbès et al., 2012a; Jebali et al., 2018) sont : $2*10^9$ UFC/m = 2 mg/kg p.c pour la LP, 1 g/Kg p.c pour la BT, 40 mg/Kg p.c pour la ZEN et 100 µg/Kg p.c pour l'AFB1.
Les 5 groupes sont :

- Groupe 1 : témoin
- Groupe 2 : souris traitées par l'AFB1+ZEN
- Groupe 3 : souris traitées par la LP+ AFB1+ZEN
- Groupe 4 : souris traitées par la BT+AFB1+ZEN
- Groupe 5 : souris traitées par la LP+BT+AFB1+ZEN

V.2.1. Étude de la toxicité générale

Cette étude consiste à suivre le comportement des animaux après traitement et évaluer le taux de mortalité s'il existe ainsi que l'évaluation du poids corporel pour les souris traitées que pour les témoins.

V.2.2. Spermogramme

V.2.2.1. Étude de la concentration et de la mobilité des spermatozoïdes épididymaires

Le nombre et la mobilité des spermatozoïdes épididymaires (spzs) ont été étudiés en utilisant la méthode de Linder et al. (1986). La queue de l'épididyme a été coupé et hachée dans 1 ml de milieu RPMI pré-incubé à 32° C. Le mélange a ensuite été incubé pendant 2

min à 32 ° C et un volume de 20 µl a été prélevé pour le comptage des spzs sur une cellule de malassez. Pour déterminer le nombre total des spz et leur pourcentage de mobilité, tous les spzs ont été comptés (mobiles et non mobiles). L'examen microscopique a été effectué à un grossissement de 40 X et chaque échantillon a été répété 3 fois.

V.2.2.2. Étude de la viabilité des spermatozoïdes épididymaires

La viabilité des spzs a été évaluée à l'aide du test de gonflement hypo-osmotique (HOS) décrit par Ven et al. (1984). Le test est basé sur l'évaluation de l'intégrité fonctionnelle de la membrane du sperme. En effet, la tête de l'épididyme a été homogénéisée dans 1 ml d'une solution hypo-osmotique. L'homogénat a ensuite été incubé à 37°C pendant 1 heure. Un dénombrement de 300 spzs a été effectué par lame à un grossissement de 40X. Chaque échantillon a été réalisé en triplicata. La viabilité est exprimée en pourcentage de spzs viables par rapport au nombre total compté.

V.2.2.3. Le spermocytogramme

La morphologie des spzs est un paramètre important de la fertilité. En particulier, un fragment de l'épididyme a été broyé dans une solution contenant du NaCl (0,9%) et du formol (10%) (1/1 : v/v). De plus, un certain volume d'eau distillée a été ajouté jusqu'à 10 ml, puis complétée par 1 ml d'éosine 1% pour la coloration. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 40 à 120 min. Ensuite, une goutte du mélange a été étalée entre la lame et la lamelle pour l'examen microscopique afin de détecter des anomalies morphologiques. L'accent a été mis principalement sur les anomalies de la tête et de la queue qui sont les parties principales des spzs. 300 spzs ont été comptés par lame (3 répétitions / échantillon). Chaque anomalie est exprimée en pourcentage du nombre total compté.

RESULTATS

CHAPITRE I : Prévalence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie

I. Activité de l'eau et teneur en eau des échantillons de blé dur

Les résultats des a_w et des mc des échantillons de blé prélevés en 2020 et 2021 à différents stades de la filière de blé dur dans les deux régions climatiques (continentale et littorale) de la Tunisie sont présentés dans le tableau 8. Tous les échantillons ont une a_w inférieure à 0,7 (plage : 0,41 à 0,67) avec la plupart des échantillons (124/136) ayant une a_w inférieure à 0,6. Tous les échantillons ont une mc entre 9% et 14% avec la plupart des échantillons (109/136) ayant une mc entre 11-12%.

Tableau 8: Activité de l'eau et teneur en eau des échantillons de blé collectés en 2020 et 2021.

Etapes de la filière (point de collecte)	**Régions**	**Activité de l'eau* min –max**		**Teneur en eau* (%) min –max**	
		2020	2021	2020	2021
Au champ	Continentale	0.57-0.67	0.44-0.49	12-14	10-11
A la récolte	Continentale	PE**	0.44-0.47	PE**	10-11
	Littorale	0.50-0.60	0.53-0.60	10-12	11-12
Au Pré-stockage	Continentale	0.58-0.59	PE**	11-12	PE**
	Littorale	0.58-0.60	PE**	11-12	PE**
Au Stockage	Continentale	0.57-0.58	0.41-0.46	11-12	09-11
	Littorale	PE**	0.47-0.51	PE**	10-11

* Moyenne de deux répétitions ; ** pas échantillons

II. Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé

II.1. Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020

Les résultats de l'occurrence des mycotoxines dans les 46 échantillons de blé collectés en 2020 sont présentés dans le tableau 9.

Les résultats montrent que 60,9 % (28/46) des échantillons de blé ont été contaminés par des mycotoxines (AFB1 et/ou enniatines). Les autres mycotoxines analysées n'ont été pas détectées (<LOD). L'AFB1 a été détectée dans 13 % (6/46) des échantillons prélevés dans la région continentale au champ, au pré-stockage et au stockage avec des concentrations allant de 17 à 37,8 µg/kg, dépassant la limite européenne de 2 µg/kg fixée pour les céréales destinées à la consommation humaine directe ou comme ingrédient dans les aliments (Commission européenne, 2023).

Les enniatines ont été détectées dans 60.9% des échantillons prélevés dans les 2 régions de collecte et aux différents stades de la filière du blé (au champ, à la récolte, au pré-stockage et au stockage). L'ENB a été le plus souvent détectée (54,3 % des échantillons prélevés) à des concentrations allant de 30 à 7684 µg/kg, suivi par l'ENB1 (39,1 %, fourchette : 48 à 1208,4 µg/kg) et de l'ENA1 (13 %, fourchette : 42 à 1410 µg/kg).

Tableau 9: Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020.

Points de collecte	**Régions**	**Nombre d'échantillons collectés**	**Mycotoxines** Échantillons positifs (fréquence %) moyenne* (µg/kg) min-max (µg/kg)				**Nombre d'échantillons positifs / nombre totale d'échantillons (fréquence %)**
			AFB1	**ENA1**	**ENB**	**ENB1**	
Au champ	Continentale	10	1 (10) 21	2 (20) 190 100-280	10 (100) 1301.3 30-7684	5 (50) 550.4 132.4-1208.4	10/10 (100)
A la récolte	Littorale	15	<LOD	1 (6.7) 1060	1 (6.7) 182.4	2 (13.3) 212 48-424	2/15 (13.3)
Au pré-stockage	Continentale	5	2 (40) 22.7 17-28.4	1 (20) 42	5 (100) 372.4 124-1266	5 (100) 286.6 74-809.4	5/5 (100)
	Littorale	11	<LOD	1 (9.1) 1410	4 (36.4) 83.3 31.3-101.2	2 (18.2) 381 152-610	6/11 (54.5)
Au stockage	Continentale	5	3 (60) 31.6 24-37.8	1 (20) 160	5 (100) 147.9 84-313.2	4 (80) 187.5 65.8-498.2	5/5 (100)

*Moyenne des échantillons positifs

II.1.1. Échantillons collectés au champ

Tous les échantillons collectés à ce point de la filière de blé ont été contaminés par au moins une mycotoxine. L'ENB a été détectée dans tous les échantillons prélevés (fourchette : 30-7684 µg/kg, moyenne : 1301,3 µg/kg), tandis que l'ENB1 a été détecté dans 50 % des échantillons prélevés à des concentrations plus faibles (fourchette : 132,4-1208,4 µg/kg, moyenne : 550,36 µg/kg) et l'ENA1 dans seulement 2 échantillons à des concentrations les plus faibles (fourchette : 100-280 µg/kg, moyenne : 190 µg/kg).

L'AFB1 a été détectée dans un seul échantillon des 10 échantillons prélevés à une concentration élevée de 21 µg/kg.

II.1.2. Échantillons collectés à la récolte

L'AFB1 n'a pas été détectée dans les échantillons de blé collectés à la récolte et seulement deux échantillons ont été contaminés par des enniatines. ENB1 a été détectée dans 2 des 15 échantillons collectés (fourchette : 48 à 424 µg/kg, moyenne : 212 µg/kg), tandis que l'ENB et l'ENA1 n'ont été trouvées que dans un seul échantillon à une concentration de 182,4 µg/kg et 1060 µg/kg, respectivement.

II.1.3. Échantillons collectés au pré-stockage

L'AFB1 a été trouvée dans 2 échantillons collectés dans la région continentale à des concentrations de 17 µg/kg et de 28,4 µg/kg (moyenne : 22,7 µg/kg) dépassant la limite européenne de 2 µg/kg. Des enniatines (ENA1, ENB et ENB1) ont été trouvées dans les deux régions climatiques. L'ENA1 était l'enniatine le moins fréquemment détecté avec une concentration plus élevée dans la région côtière (1410 µg/kg) que dans la région continentale (42 µg/kg). L'ENB et l'ENB1 ont été détectées dans tous les échantillons de blé prélevés dans la région continentale à des concentrations variant de 124 à 1266 µg/kg (moyenne : 372,4 µg/kg) pour l'ENB et de 74 à 809,4 µg/kg (moyenne : 286,6 µg/kg) pour l'ENB1, alors que ces deux enniatines ont été trouvées respectivement dans seulement 4 et 2 des 11 échantillons collectés dans la région littorale, avec des concentrations allant de 31,3 à 101,2 µg/kg (moyenne : 83,3 µg/kg) pour l'ENB et de 152 à 610 µg/kg (moyenne : 381 µg/kg) pour l'ENB1.

II.1.4. Échantillons collectés au stockage

L'AFB1 a été détectée dans 3 échantillons (60 %) à des concentrations variantes entre 24 et 37,8 µg/kg (moyenne = 31,6 µg/kg) dépassant la limite européenne de 2 µg/kg.

L'ENB a été détectée dans tous les échantillons collectés (fourchette : 84-313,2 µg/kg, moyenne : 147,9 µg/kg) et l'ENB1 dans 80 % des échantillons collectés (fourchette : 65,8-

498,2 µg/kg, moyenne : 187,5 µg/kg), alors que l'ENA1 a été détectée dans un seul échantillon à une concentration de 160 µg/kg.

II.2. Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021

Les résultats de l'occurrence des mycotoxines dans les 90 échantillons de blé dur collectés en 2021 sont présentés dans le tableau 10.

Les résultats montrent que 34,4 % (31/90) des échantillons ont été contaminés uniquement par des enniatines et tous ont été prélevés dans la région littorale au moment de la récolte et du stockage. Les autres mycotoxines analysées n'ont été pas détectées (<LOD). La mycotoxine ENB était la plus fréquente (32,2 % des échantillons collectés) et abondante (90,2 à 607,6 µg/kg), suivie par la mycotoxine ENB1 (17,8 %, fourchette : 5,6 à 100 µg/kg). Un seul échantillon a été contaminé par l'ENA1 à une concentration de 83,4 µg/kg.

II.2.1. Échantillons collectés au champ

Aucune mycotoxine n'a été détectée dans les échantillons de blé collectés au champ.

II.2.2. Échantillons collectés à la récolte

Aucune mycotoxine n'a été détectée dans les échantillons prélevés à ce point de la filière dans la région continentale, tandis que tous les échantillons de la région littorale ont été contaminés par au moins une enniatine. L'ENB était la mycotoxine la plus fréquente (96,7 %) et la plus abondante (fourchette : 90,2-607,6 µg/kg, moyenne : 238,5 µg/kg), suivie par l'ENB1 (50 %, fourchette : 5,6-100 µg/kg, moyenne : 112,7 µg/kg). L'ENA1 n'a été détectée que dans un échantillon à une concentration de 83,4 µg/kg.

II.2.3. Échantillons collectés au stockage

Aucune AFB1 n'a été détectée et un seul échantillon prélevé dans la région littorale a été contaminé par l'ENB1 à une concentration de 50,2 µg/kg.

Tableau 10: Occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021.

Points de collecte	**Régions**	**Nombre d'échantillons collectés**	**Mycotoxines** Échantillons positifs (fréquence %) moyenne* (µg/kg) min-max (µg/kg)			**Nombre d'échantillons positifs / nombre totale d'échantillons (fréquence %)**
			ENA1	**ENB**	**ENB1**	
Au champ	Continentale	20	<LOD	<LOD	<LOD	0
A la récolte	Continentale	10	<LOD	<LOD	<LOD	0

Points de collecte	Régions	Nombre d'échantillons collectés	Mycotoxines Échantillons positifs (fréquence %) moyenne* (µg/kg) min-max (µg/kg)			Nombre d'échantillons positifs / nombre totale d'échantillons (fréquence %)
			ENA1	ENB	ENB1	
	Littorale	30	1 (3.3) 83.4	29 (96.7) 238.5 90.2-607.6	15 (50) 112.7 5.6-100	30/30 (100)
Au stockage	Continentale	20	<LOD	<LOD	<LOD	0
	Littorale	10	<LOD	<LOD	1 (10) 50.2	1/10 (10)

*Moyenne des échantillons positifs

III. Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé

Les résultats montrent bien que les échantillons de blé dur sont contaminés par plus d'une seule mycotoxine, il y a jusqu'à 4 mycotoxines dans 22,8 % (31/136) des échantillons de blé dur collectés, 39,1 % (18/46) en 2020 et 14,4 % (13/90) en 2021, tandis que 21,7 % (10/46) et 20 % (18/90) des échantillons ont été contaminés par une seule mycotoxine en 2020 et en 2021, respectivement.

III.1. Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020

Les résultats de la multi-contamination des échantillons de blé par les mycotoxines sont présentés dans le tableau 11.

La contamination multi-mycotoxines a été observée plus fréquemment dans la région continentale aux différents stades (au champ, au pré-stockage et au stockage), avec une contamination par l'AFB1 et les enniatines ou seulement les enniatines. Au champ, 4/10 échantillons collectés ont été contaminés par une seule mycotoxine, 5 par 2 (ENB+ENB1) ou 3 (ENA1+ENB+ENB1) enniatines et un par AFB1 et ENB. Tous les échantillons collectés dans la région continentale au pré-stockage (5) et au stockage (5) ont été contaminés par 2 à 4 mycotoxines : 2 ou 3 échantillons avec (ENB+ENB1) et un échantillon avec (AFB1+ENB), et dans chacune de ces deux étapes, un échantillon avec AFB1+ENB+ENB1 et un échantillon avec AFB1 et les 3 enniatines (ENA1+ENB+ENB1). Dans la région littorale, un seul échantillon a été contaminé par plus d'une enniatine au moment de la récolte (ENA1+ENB+ENB1) et au pré-stockage (ENB+ENB1).

Tableau 11: Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2020.

Point de collecte	Régions	Contamination par 1 mycotoxine (nombre d'échantillons positifs, fréquence %)	Co-occurrence des mycotoxines (nombre d'échantillons positifs, fréquence %)			
			Contamination par 2 mycotoxines	Contamination par 3 mycotoxines	Contamination par 4 mycotoxines	Total
Au champ	Continentale	(4, 40)	AFB1+ ENB (1, 10) ENB+ ENB1 (3, 30)	ENA1+ENB+ENB (2, 20)	0	(6, 60)
A la récolte	Littorale	(1, 6.7)	0	ENA1+ENB+ENB (1, 6.7)	0	(1, 6.7)
Pré-stockage	Continentale	0	ENB+ENB1 (3, 60)	AFB1+ENB+ENB (1, 20)	AFB1+ENA1+ENB+ENB1 (1, 20)	(5, 100)
	Littorale	(5, 45.4)	ENB+ENB1 (1, 9.1)	0	0	(1, 9.1)
Stockage	Continentale	0	AFB1+ENB (1, 20) ENB+ ENB1 (2, 40)	AFB1+ENB+ENB (1, 20)	AFB1+ENA1+ENB+ENB1 (1, 20)	(5, 100)

III.2. Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021

Les résultats de la multi-contamination des échantillons de blé par les mycotoxines sont présentés dans le tableau 12.

La co-occurrence des enniatines n'a été observée que dans les échantillons de blé collectés dans la région littorale au moment de la récolte, 40 % (12/30) des échantillons ont été contaminés par 2 enniatines (ENB+ENB1) et un échantillon par 3 enniatines (ENA1+ENB+ENB1).

Tableau 12: Co-occurrence des mycotoxines dans les échantillons de blé collectés en 2021.

Point de collecte	Régions	Contamination par 1 mycotoxine (nombre d'échantillons positifs, fréquence %)	Co-occurrence des mycotoxines (nombre d'échantillons positifs, fréquence %)		
			Contamination par 2 mycotoxines	Contamination par 3 mycotoxines	Total
A la récolte	Littorale	(17, 56.7)	ENB+ ENB1 (12, 40)	ENA1+ENB+ENB (1, 3.3)	(13, 43.3)
Stockage	Littorale	(1, 10)	0	0	0

IV. Pratiques culturales utilisées pour les échantillons de blé collectés en 2020 et 2021

Les pratiques culturales des échantillons de blé collectés en 2020 et 2021 sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13: Pratiques culturales utilisées pour les échantillons de blé collectés en 2020 et 2021.

<table>
<tr><th rowspan="2">Année de récolte</th><th rowspan="2">Point de la filière</th><th rowspan="2">Régions</th><th rowspan="2">Nombre total d'échantillons</th><th colspan="6">Pratiques culturales, fréquence (%)</th></tr>
<tr><th>Irrigation</th><th>Labour</th><th>Enlèvement des débris de blé d'une année à l'autre</th><th>Fertilisation</th><th>Traitement par des fongicides</th><th>Traitement par des insecticides/herbicides</th></tr>
<tr><td rowspan="6">2020</td><td>Au champ</td><td>Continentale</td><td>10</td><td rowspan="9">100</td><td>10</td><td>100</td><td>10</td><td>10</td><td>10</td></tr>
<tr><td>A la récolte</td><td>Littorale</td><td>15</td><td rowspan="10">100</td><td>53</td><td>66.6</td><td>66.6</td><td>100</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Pré-stockage</td><td>Continentale</td><td>5</td><td rowspan="6">100</td><td rowspan="2">100</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td>Littorale</td><td>11</td><td>72.7</td><td>0</td></tr>
<tr><td>Stockage</td><td>Continentale</td><td>5</td><td>60</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td rowspan="5">2021</td><td>Au champ</td><td>Continentale</td><td>20</td><td rowspan="4">100</td><td rowspan="3">100</td><td>90</td><td>90</td></tr>
<tr><td rowspan="2">A la récolte</td><td>Continentale</td><td>10</td><td>100</td><td>100</td></tr>
<tr><td>Littorale</td><td>30</td><td>93</td><td>60</td><td>33.3</td><td>33.3</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Stockage</td><td>Continentale</td><td>20</td><td rowspan="2">100</td><td rowspan="2">100</td><td rowspan="2">100</td><td rowspan="2">100</td></tr>
<tr><td>Littorale</td><td>10</td></tr>
</table>

V. Estimation de l'apport quotidien en mycotoxines et le facteur de risque sur le consommateur tunisien

Les valeurs moyennes obtenues et l'apport quotidien probable pour chaque mycotoxine sont présentées dans le tableau 14. En Tunisie, la consommation de blé était de 717 g/habitant/jour (Ayed et al., 2021) pour la population adulte totale (70 kg de poids corporel).

Les résultats montrent que le PDI en AFB1 après la consommation des échantillons de blé collecté est de l'ordre de 35.8 ng/kg pc/jour chez les adultes.

En 2020, le PDI en enniatines était de 679,6 ng/kg pc/jour pour l'ENA1, de 3592,2 ng/kg pc/jour pour l'ENB et de 1363,3 ng/kg pc/jour pour l'ENB1. Toutefois, en 2021, le PDI en enniatines a été diminué à 9,21 ng/kg pc/jour pour l'ENA1, 786,6 ng/kg pc/jour pour l'ENB et 102,4 ng/kg pc/jour pour l'ENB1.

Tableau 14: Apport quotidien en mycotoxines (PDI).

Année de récolte	Nombre d'échantillons totales	Mycotoxines							
		AFB1		ENA1		ENB		ENB1	
		Moyenne* (µg/kg)	PDI (ng/kg. pc/day)	Moyenne* (µg/kg)	PDI (ng/kg. pc/day)	Moyenne* (µg/kg)	PDI (ng/kg. pc/day)	Moyenne* (µg/kg)	PDI (ng/kg. pc/day)
2020	46	3.5	35.8	66.3	679.6	350.7	3592.2	133.1	1363.3
2021	90	-	-	0.8	9.2	76.8	786.6	10.0	102.4

*Moyenne des échantillons total

CHAPITRE II : Capacité des bactéries lactiques a adsorber/absorber les mycotoxines *in vitro*

I. Interaction LAB (LP et LB) / mycotoxines (AFB1, AFM1, OTA et ZEN)

I.1. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines par LAB en fonction du temps d'incubation

Les résultats présentés dans le tableau 15 révèlent que la bactérie LP viable est capable d'éliminer l'AFB1 et l'AFM1 du milieu avec un pourcentage d'élimination de 89±7,2% et de 86±5,5%, respectivement. La bactérie LB présente plus d'affinité à la ZEN et à l'OTA qu'a l'AFB1 et l'AFM1. Le pourcentage d'élimination de la ZEN et de l'OTA est élevé et varie de 82±7,2% pour l'OTA à 87±6,3% pour la ZEN après 24h d'incubation.

Tableau 15: Pourcentage d'élimination d'AFB1 (20 µg/ml), AFM1 (20 µg/ml), OTA (20 µg/ml), et ZEN (40 µg/ml) par les LAB (10^8 CFU/ml) viables.

	Pourcentage d'élimination					
	LP			LB		
	0h	6h	24h	0h	6h	24h
PBS	5±1,3*	6±2,5*	5±1,6*	4±1,6*	7±2,2*	5±2,6*
AFB1	25±2,5*	64±6,4*	89±7,2*	23±2,3*	41±4,5*	52±5,3*
AFM1	26±3,8*	62±6,3*	86±5,5*	23±2,4*	42±3,6*	52±4,2*
OTA	18±1,4*	44±4,3*	59±5,8*	23±2,9*	58±4,7*	82±7,2*
ZEN	24±3,2*	48±2,5*	54±4,4*	25±2,3*	64±5,5*	87±6,3*

* Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (écart-type) de trois essais.

I.2. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines par LAB en fonction de l'état des LAB (viables/non viables)

Les résultats résumés dans le tableau 16 montrent que les bactéries viables, à l'état planctonique, sont capables d'éliminer plus les mycotoxines du milieu PBS. Les pourcentages d'élimination assurés par la bactérie LP allant de 84±4,6 jusqu'à 89±7,1% pour l'AFB1 et l'AFM1, respectivement. Tandis que, la bactérie LB élimine plus l'OTA et la ZEN et les pourcentages d'élimination sont respectivement 82±7,2 et 87±6,3. Lorsqu'elles sont tuées à la chaleur (dénaturées) ou par le HCl, il y a aussi élimination des mycotoxines mais le pourcentage d'élimination est faible indiquant une possibilité d'adhésion. Le meilleur résultat assuré par la bactérie lorsqu'elle est vivante et à l'état planctonique indiquent que les deux bactéries assurent l'élimination d'une majeure partie de la mycotoxine par métabolisation.

Tableau 16: Pourcentage d'élimination d'AFB1 (20 µg/ml), AFM1 (20 µg/ml), OTA (20 µg/ml) et ZEN (40 µg/ml) par les LAB (10^8 CFU/ml) viables et non viables (traitées par la chaleur et par le HCl).

	Pourcentage d'élimination					
	LP			LB		
	Cellules Viables	Cellules non viables (traitées par la chaleur)	Cellules non viables (traitées par le HCl)	Cellules Viables	Cellules non viables (traitées par la chaleur)	Cellules non viables (traitées par le HCl)
AFB1	89±7,1*	26±2,6 *	42±5,2*	52±5,3*	18±2, 3*	29±2,9*
AFM1	84±4,6*	23±5,2 *	39±4,6 *	52±4,2 *	20±1, 8*	29±2,7*
OTA	59±5,8*	20±3,9 *	32±4,2*	82±7,2*	14±6, 1*	29±3,1*
ZEN	54±4,5*	13±5,2 *	19±2,6*	87±6,3*	20±1, 8*	29±2,7*

* Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois essais.

I.3. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction des concentrations bactériennes

L'analyse de données de la figure 13 indique que le pouvoir d'élimination de mycotoxines est proportionnel à la concentration de la culture bactérienne où la bactérie LP a pu diminuer le pourcentage des aflatoxines de 80 à 35% et de 85 à 25% dans les surnageants pour l'AFB1 et AFM1, respectivement, avec une concentration de LP égale à 10^{11} UFC/ ml. De même, la figure 14 montre aussi que la LB a éliminé les mycotoxines dans le surnageant avec des pourcentages allant de 87 à 25% et de 80 à 35% pour la ZEN et l'OTA respectivement avec une concentration de la suspension bactérienne égale à 10^{11} UFC/ ml.

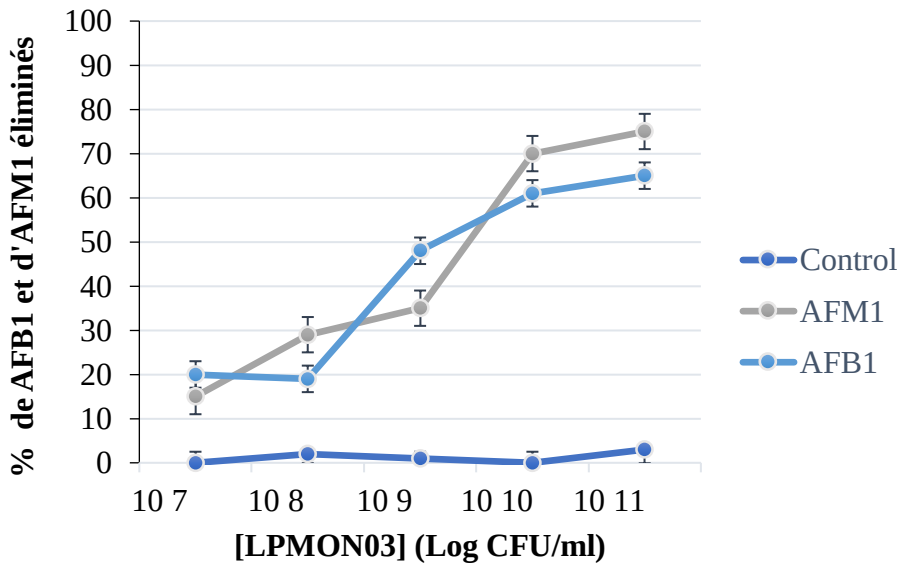


Figure 13: Pourcentage d'élimination d'AFB1 (20 µg/ml) et d'AFM1 (20 µg/ml) par LP (10^8 CFU/ml) viables en fonction du nombre des cellules du milieu. Moyenne ± SD de trois essais.

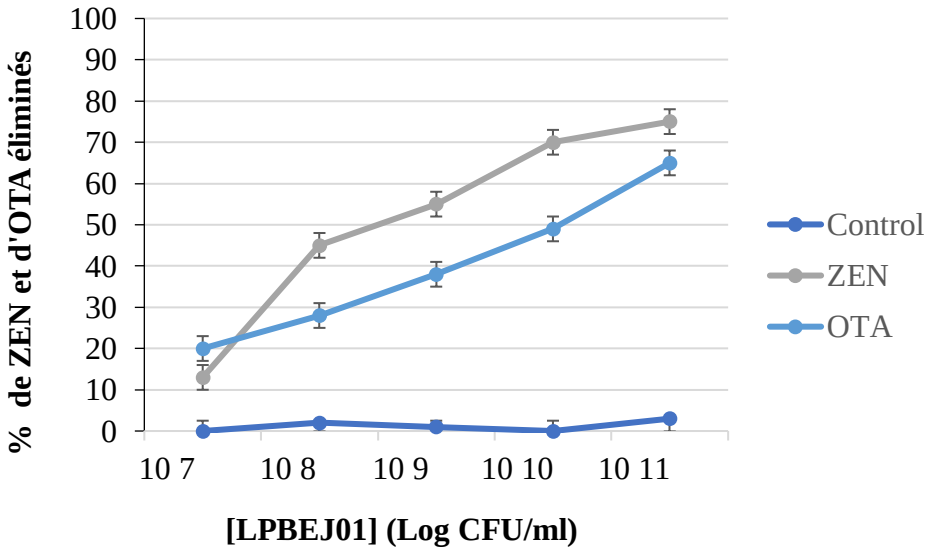


Figure 14: Pourcentage d'élimination de ZEN (40 µg/ml) et d'OTA (20 µg/ml) par LB (10^8 CFU/ml) viables en fonction du nombre des cellules du milieu. Moyenne ± SD de trois essais.

I.4. Évaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction du pH du milieu

Les figures 15 et 16 montrent que le pourcentage d'élimination de mycotoxines augmente en fonction de pH. En effet, le pourcentage d'élimination est de 15% avec un pH 3.5 pour les deux espèces de bactéries utilisées LB et LP. Le pourcentage d'élimination augmente

à 56 et 65% avec un pH 6.5 pour les deux espèces des bactéries utilisées. On peut dire que les souches bactériennes donnent un rendement de métabolisation et/ou d'adhésion le plus important avec un pH basique.

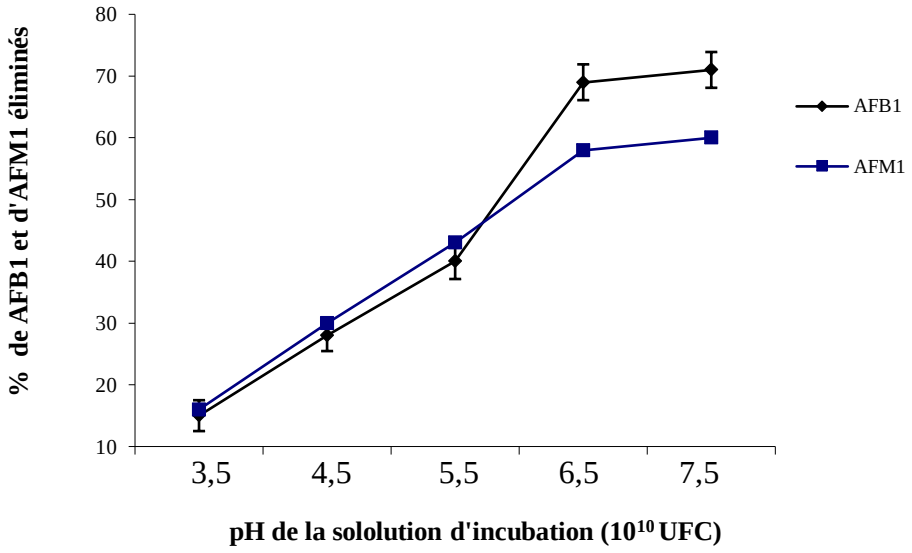


Figure 15: Pourcentage d'élimination d'AFB1 (20 µg/ml) et d'AFM1 (20 µg/ml) par LP (10^8 CFU/ml) viables en fonction de pH du milieu. Moyenne ± SD de trois essais.

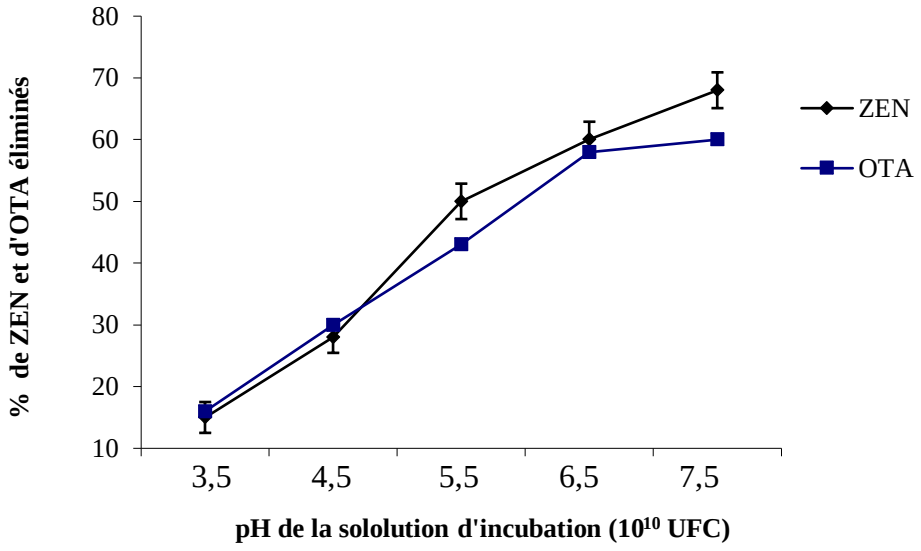


Figure 16: Pourcentage d'élimination de ZEN (40 µg/ml) et d'OTA (20 µg/ml) par LB (10^8 CFU/ml) viables en fonction de pH du milieu. Moyenne ± SD de trois essais.

I.5. Evaluation du pouvoir d'élimination des mycotoxines en fonction de la présence des cofacteurs (NaCl, $MgCl_2$ et $CaCl_2$)

L'analyse des données des figures 17 et 18 montre que l'enrichissement du milieu de culture des souches LP et LB viables en NaCl, $MgCl_2$, et $CaCl_2$ influencent le pouvoir de

métabolisation des bactéries. En effet, le meilleur rendement de métabolisation de l'AFB1 et de l'AFM1 en présence de la souche LP est observé avec un enrichissement du milieu en $MgCl_2$. Par contre, le meilleur rendement de métabolisation de ZEN et d'OTA est observé en présence de la souche LB avec un enrichissement du milieu en $CaCl_2$. La culture de deux espèces bactériennes en présence de NaCl diminue le pouvoir de métabolisation des bactéries.

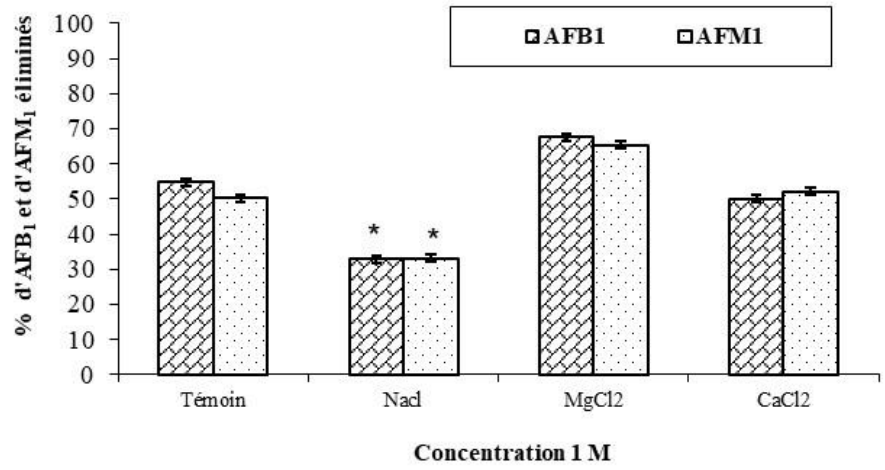


Figure 17: Effets d'enrichissement de milieu de culture en NaCl, MgCl2, et CaCl2 sur l'élimination d'AFB1 (20 µg/ml) et AFM1 (20 µg/ml) par la LP (10^8 CFU/ml) après 6 h d'incubation. Moyenne ± SD de trois essais.

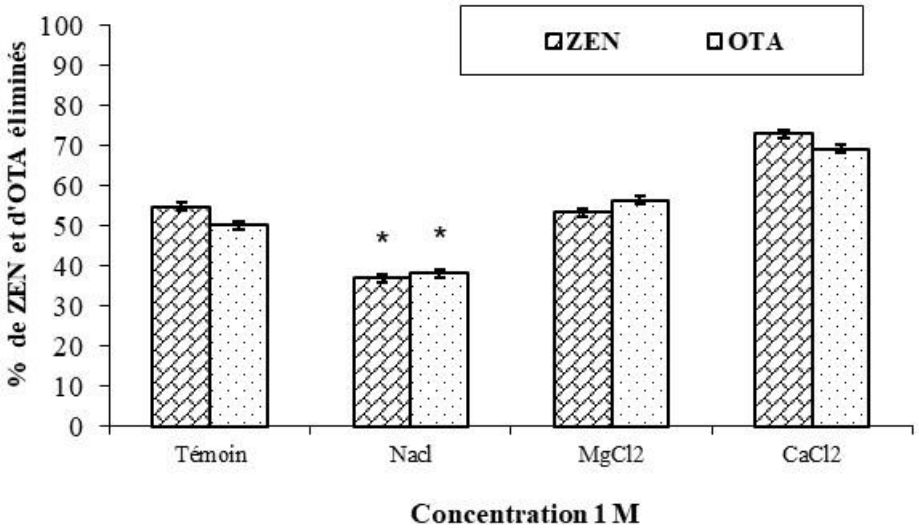


Figure 18: Effets d'enrichissement de milieu de culture en NaCl, MgCl2, et CaCl2 sur l'élimination d'OTA (20 µg/ml) et ZEN (40 µg/ml) par la LB (10^8 CFU/ml) après 6 h d'incubation. Moyenne ± SD de trois essais.

II. Interaction LAB (LP, LB et LR) / mycotoxine (ENB) en fonction de différents facteurs

Les résultats montrent que les 3 bactéries ont été capables d'éliminer l'ENB dans leurs différents états et à différents pHs du milieu. Les LAB non viables ont été capables d'éliminer plus d'ENB que les LAB viables. Les LAB viables ont eu une capacité d'élimination plus élevée à pH acide (3.5) qu'à pH basique (7.5) mais les LAB traitées par la chaleur ont gardé leur capacité d'élimination élevée quel que soit le pH (Tableaux 17 et18).

Le pourcentage d'élimination de LP viable a été de 76.31±8.34% à pH 3.5 et de 52.45±2.26% à pH 7.5. LP non viable a la même capacité d'élimination de l'ENB quel que soit le pH, elle a éliminé 82.99±8.45% de la toxine à pH 3.5 et 84.97±0.58% à pH 7.5.

La LB viable a permis de réduire un taux plus élevé de l'ENB à pH 3.5 (84.14±4.41%) qu'à pH 7.5 (63.13±5.03%). La LB non viable a la même capacité d'élimination de l'ENB quel que soit le pH, elle a éliminé 90.21±0.48% de la toxine à pH 3.5 et 84.43±1.12% à pH 7.5.

La LR viable a la capacité d'éliminer 81.99±5.04% de la toxine à pH 3.5 et 35.71±9.6% de la toxine à pH 7.5. La LR non viable a la même capacité d'élimination de l'ENB quel que soit le pH, elle a éliminé 88.39±1.48% de la toxine à pH 3.5 et 84.75±2.60% à pH 7.5.

Tableau 17: Pourcentage d'élimination d'ENB (50 µg/ml) par les LAB (10^8 CFU/ml) viables et non viables à pH 3.5.

Pourcentage d'ENB éliminée					
LP		LB		LR	
Cellules viables	Cellules non viables	Cellules viables	Cellules non viables	Cellules viables	Cellules non viables
76,31±8,34*	82,99±8,45*	84,14±4,41*	90,21±0,48*	81,99±5,04*	88,39±1,48*

* Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests.

Tableau 18: Pourcentage d'élimination d'ENB (50 µg/ml) par les LAB (10^8 CFU/ml) viables et non viables à pH 7.5.

Pourcentage d'ENB éliminée					
LP		LB		LR	
Cellules Viables	Cellules non viables	Cellules Viables	Cellules non viables	Cellules Viables	Cellules non viables
52,45±2,26*	84,97±0,58*	63,13±5,03*	84,43±1,12*	35,71±9,6*	84,75±2,60*

* Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD de trois tests

CHAPITRE III : Étude de la toxicité de *Lactobacillus plantarum* MON03 et de l'argile de type bentonite sur des lignées cellulaires et de leur capacité à protéger les cellules Caco-2 contre la génotoxicité induite par l'AFB1 et la ZEN

I. Étude de la cytotoxicité de la bentonite et de la *L. plantarum MON03* par détermination de leur CI_{50} chez certaines lignées cellulaires

La CI_{50} *in vitro* est déterminé par la technique de sel tétrazolium MTT (bromure de 3(4,5-dimméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium) selon Mosmann en 1983. Après 12h d'exposition l'effet cytotoxique de la BT et de la LP qui provoque 50% d'inhibition de la prolifération des 5 lignées cellulaires est déterminé. Les Caco-2, les C5-O et les leucocytes présentent les CI_{50} les plus élevées par rapport aux autres lignées cellulaires et qui sont de l'ordre de 5,2 mg/ml, 10^{12} UFC/ml; 4,8 mg/ml, 10^{11} UFC/ml et 4,4 mg/ml, 10^{8} UFC/ml respectivement. Pour les cellules Véro et les Hep-G2, la BT et la LP présentent une CI_{50} de l'ordre de 2,2 mg/ml, 10^{8} UFC/ml et 2,9 mg/ml, 10^{8} UFC/ml respectivement (Figure 19 et 20).

Ces résultats ne représentent pas un indice de toxicité de la BT ou de la LP pour les différentes lignées cellulaires car les CI_{50} trouvées sont toutes de l'ordre de milligrammes et $\geq 10^{8}$ UFC/ml (tableau 19).

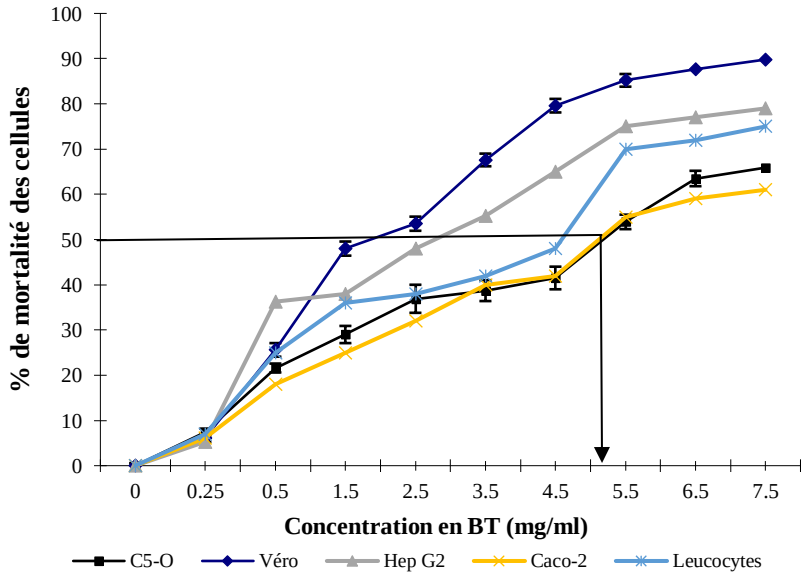


Figure 19: Détermination de la CI50 de la BT en présence des C5-O, des Véro, des Hep G2, des Caco-2 et des leucocytes par le test MTT.

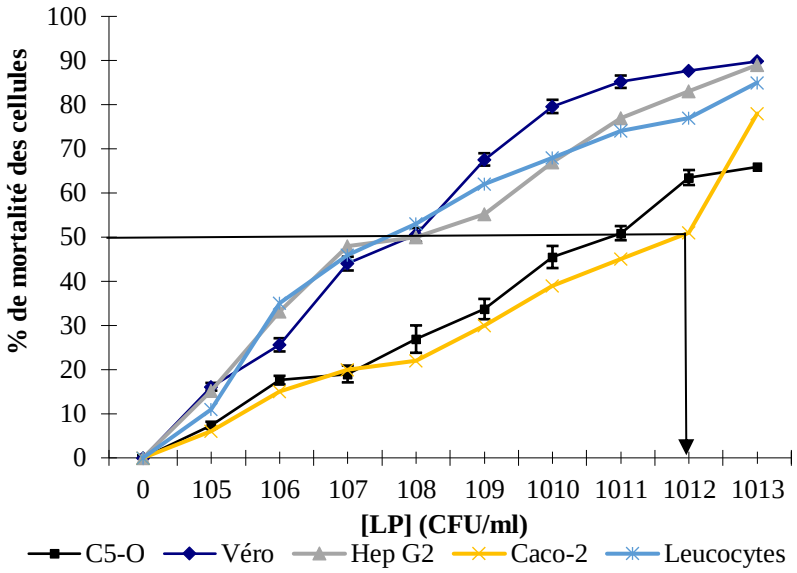


Figure 20: Détermination de la CI_{50} de la LP en présence des C5-O, des Véro, des Hep G2, des Caco-2 et des leucocytes par le test MTT.

Tableau 19: La CI50 de la BT et de la LP mesurée par la technique MTT après 48h d'exposition des leucocytes, des Caco-2, des C5-O, des HepG2 et des Véro.

	CI_{50} des adsorbants en mg/ml et UFC/ml				
	Leucocytes	**Caco-2**	**C5-O**	**HepG2**	**Véro**
BT	4,4	5,2	4,8	2,9	2,2
LP	10^8	10^{12}	10^{11}	10^8	10^8

II. Évaluation de la toxicité et de l'effet préventif de la BT et de la LP contre l'AFB1 et la ZEN inductrices de la fragmentation d'ADN et de l'apoptose sur les cellules : Caco-2

II.1. Résultats de fragmentation d'ADN sur électrophorèse

La génotoxicité de la ZEN et de l'AFB1 est confirmée puisqu'elles induisent la fragmentation d'ADN et l'apoptose chez les cellules Caco-2.

La fragmentation d'ADN est observée chez les cellules Caco-2 incubées respectivement avec 40 µM de ZEN et 100 nM d'AFB1. Cette fragmentation est plus accentuée chez les cellules Caco-2 en présence de la ZEN que chez les cellules incubées avec l'AFB1. Après l'électrophorèse il y a génération des fragments d'ADN de taille variant entre 750 et 2000 paires de bases qui sont clairement visibles sur la figure 21 (A et B). L'analyse des cultures témoins

des cellules Caco-2 ne montre aucun fragment d'ADN spécifique. L'incubation des Caco-2 avec 0,5 mg/ml de BT et/ou de LP ne montre aucun signe de génotoxicité. L'association de 0,5 mg/ml de BT et 10^3 UFC/ml de LP avec 40 µM de ZEN inhibe efficacement la menace de cette mycotoxine sur le génome cellulaire. Le même effet préventif est observé lors de l'incubation de la BT et de LP avec l'AFB1. En présence des cellules Caco-2 la diminution de la biodisponibilité de l'AFB1 est nettement observée dans la figure 21-B mais dans ce cas la BT et la LP offrent plus d'affinité à l'AFB1 qu'à la ZEN.

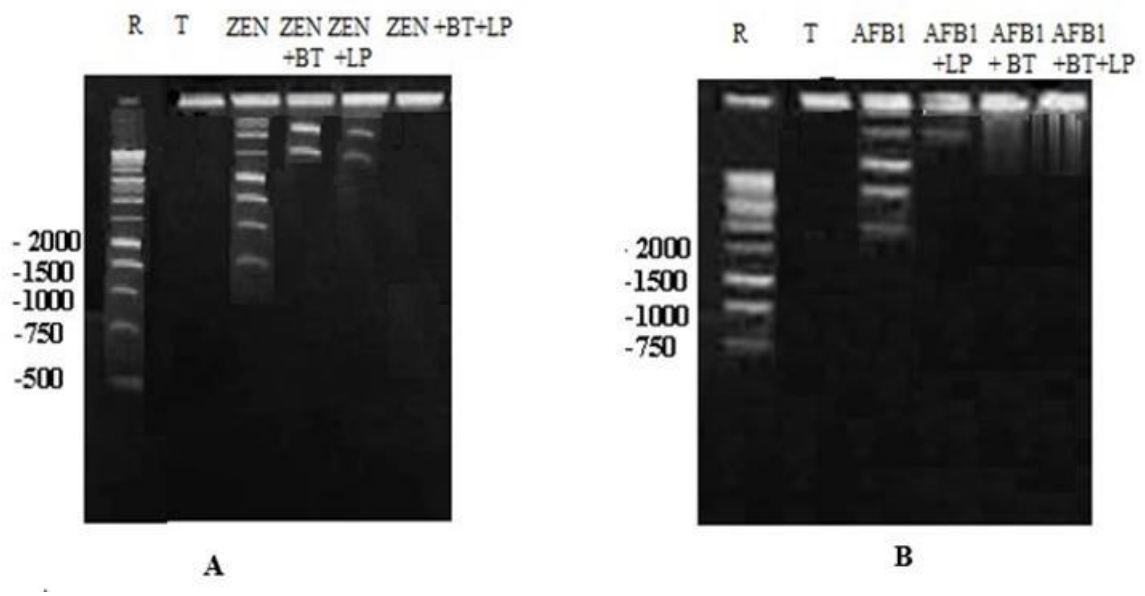
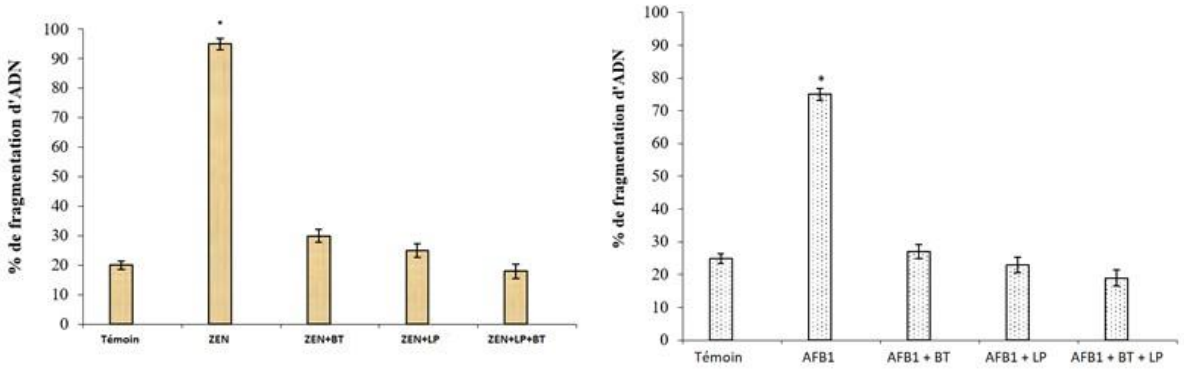


Figure 21: Fragmentation d'ADN sur gel d'agarose chez les cellules Caco-2 induite par la ZEN (40 µM) (A) et par l'AFB1 (100 nM) (B) et rôle préventif de la BT (0.5 mg/ml) et de la LP (10^3 UFC/ml).

II.2. Analyse quantitative de la fragmentation d'ADN

L'analyse quantitative de la fragmentation d'ADN (Figure 22A et 22B) montre un effet génotoxique significatif après 24h d'incubation avec la ZEN et l'AFB1. Ces deux mycotoxines présentent un risque de toxicité sur l'ADN allant respectivement de 75% à 95%. Ces pourcentages se réduisent à 30% lorsque la ZEN est combinée à la BT, à 25% et à 18 lorsqu'elle est associée à la LP et à la BT+LP respectivement chez des cellules Caco-2 en culture. La combinaison de ces deux 1adsorbants avec l'AFB1 en présence des cellules Caco-2 en culture réduit significativement la génotoxicité de cette mycotoxine à 27% lorsqu'elle est associée à la BT et à 23% lorsqu'elle est associée à la LP et à 19% lorsqu'elle est associée à la BT+LP en combinaison. L'analyse quantitative de la fragmentation d'ADN confirme bien les résultats d'électrophorèse concernant l'affinité de BT et de la LP à la ZEN et à l'AFB1. En général, la BT

et la LP sont deux agents adsorbants très efficaces contre la génotoxicité de la ZEN et de l'AFB1 par réduction de leur biodisponibilité.

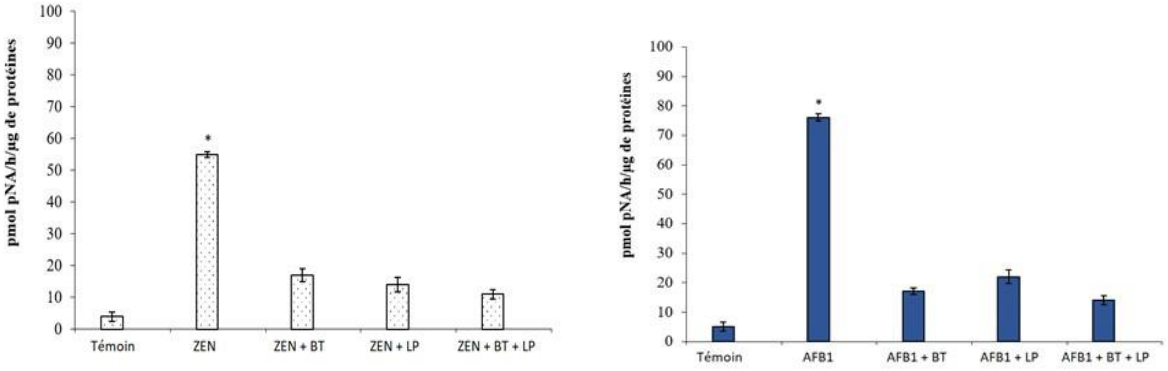


A B

Figure 22: Fragmentation d'ADN chez des cellules Caco-2 incubées en présence de la ZEN (40 µM) (A) et l'AFB1 (100 nM) (B) et rôle préventif de la BT (0.5 mg/ml) et de la LP (10^3 UFC/ml). Moyenne±SD de trois exemplaires.

II.3. Mesure de l'activité caspase-3

Les cellules Caco-2 traitées avec 40 µM de ZEN montrent une nette augmentation de l'activité caspase-3 (55 pmol pNA/h/µg de protéines) par rapport aux cellules témoins et aux cellules traitées par la BT et/ou la LP en co-traitement. Cette activité est de 76 pmol pNA/h/µg de protéines chez les cellules Caco-3 traitées par l'AFB1 seule et elle diminue à 14 pmol pNA/h/µg de protéines chez celles traitées par l'AFB1 combinée avec la BT et la LP (Figure 23A). La figure 23B montre que l'activité caspase-3 est de l'ordre de 55 pmol pNA/h/µg de protéines et diminue suite à la combinaison de la ZEN à la BT et à la LP et à la BT+LP à 17; 14 et 11 pmol pNA/h/µg de protéines respectivement.



A B

Figure 23: Activité caspase-3 dans les cellules Caco-2 induite par la ZEN (40 µM) (A) et par l'AFB1 (100 nM) (B) et rôle préventif de la BT (0.5 mg/ml) et de la LP (10^3 UFC/ml). Moyenne±SD de trois exemplaires.

CHAPITRE IV : Évaluation *in vivo* du pouvoir de détoxification des mycotoxines (AFM1, AFB1 et ZEN) par les LAB et/ou la bentonite

Cette étude visait à étudier, *in vivo*, la capacité des bactéries lactiques (*lactobacillus rhamnosus* GAF01 ou *lactobacillus plantarum* MON03) et/ou de l'argile (bentonite) à réduire l'immunotoxicité, l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et le stress oxydatif induite par l'AFM1 et la reprotoxicité induite par l'AFB1 + ZEN chez les souris male Balb/c.

I. Pouvoir préventif de *L. rhamnosus* GAF06 et/ou bentonite vis-à-vis l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et l'immunotoxicité de l'AFM1 *in vivo*

L'étude *in vivo* a été menée à l'aide des souris Balb/c mâles traitées, par voie orale, par l'AFM1 seule ou en association avec LR et/ou BT, quotidiennement pendant 10 jours, comme suit : groupe témoin 1, groupe 2 traité par LR seule (2,108 UFC/mL), groupe 3 traité par BT seul (1g/kg pc), groupe 4 traité avec AFM1 seule (100 µg/kg), groupe 5 co-traité avec LR+AFM1, groupe 6 co-traité avec BT+AFM1, groupe 7 co-traité avec BT+LR+AFM1. Les concentrations de l'AFM1, de BT et de LR choisies sont selon Abbès et al. (2012b, 2013).

I.1. Étude de la toxicité générale

Les signes de toxicité d'ordre général ont été enregistrés tout au long de la période de traitement.

I.1.1. Effet sur la létalité

Pendant la période de traitement, aucune mortalité de souris traitées par l'AFM1 n'est notée. Cependant, les souris sont apparues cliniquement anormales et des troubles de comportement et de mouvement et une perte d'appétit sont observés. Le traitement par la LR et l'argile seules et en Co-traitement n'ont montré aucun signe de toxicité.

I.1.2. Effet sur le refus du repas

Le suivi de la consommation de la nourriture le long de la période de traitement est illustré par la figure 24. Il montre que l'effet de traitement par l'AFM1 diminue considérablement la quantité de nourriture consommée par les souris. Les souris traitées par la LR, BT, AFM1+LR, AFM1+BT ou le mélange LR+BT combinée à l'AFM1 en co-traitement ont montré une augmentation de la quantité de la nourriture consommée.

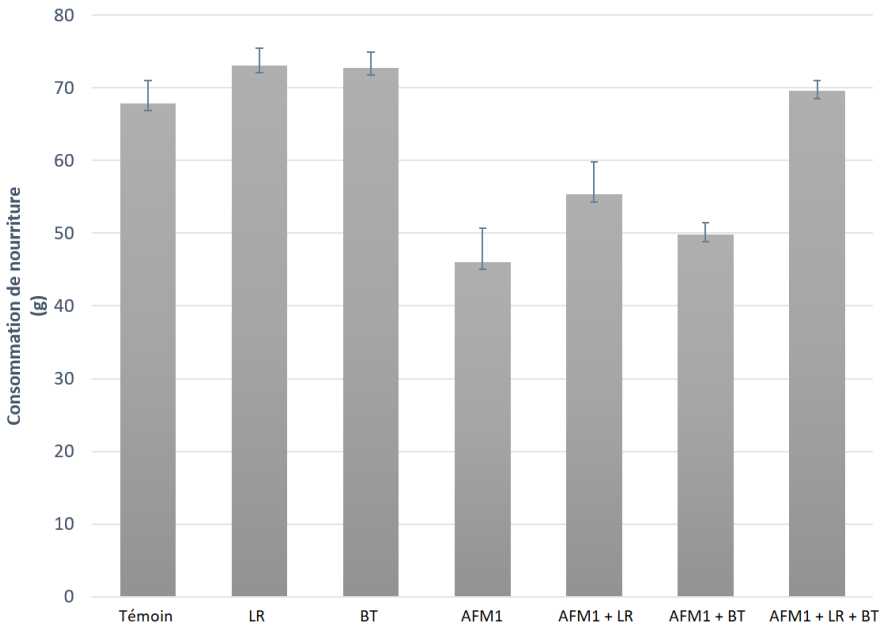


Figure 24: Effets du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur la consommation alimentaire des souris.

I.1.3. Effet sur le gain de poids

À la fin de la période du traitement, les souris traitées par la bactérie LR seule, l'argile seule et de l'AFM1 plus LR et/ou BT ont augmenté de poids par rapport aux poids initiaux. En revanche chez les souris traitées à l'AFM1 seule, on observe une perte de poids avec une apparition des signes de toxicité sur l'animal (Figure 25).

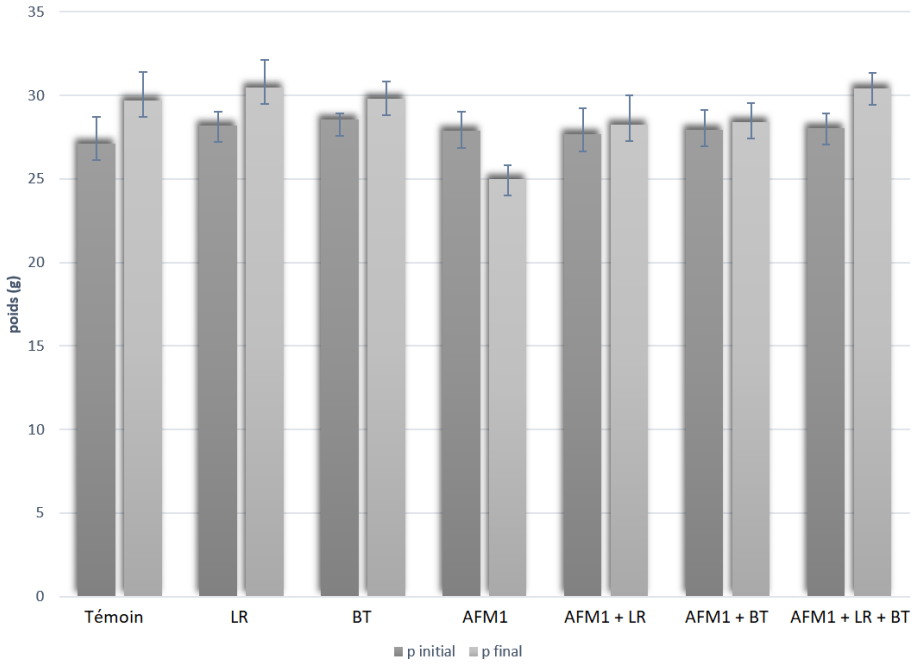


Figure 25: Effets du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur le poids des souris Balb/c.

I.2. Étude des paramètres biochimiques

Les résultats présentés dans le tableau 20 ont montré une altération de l'activité biochimique du lot traité par l'AFM1 seule. On a noté une diminution significative d'albumine sérique, des protéines totales, du cholestérol et d'acide urique indiquant un dommage cellulaire. Le co-traitement par l'AFM1+LR et/ou BT a rétabli ces paramètres dont les valeurs étaient proches des valeurs normales retrouvées chez les souris témoins.

Tableau 20: Effets du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur les paramètres biochimiques.

Paramètres	**Témoin**	**LR**	**BT**	**AFM1**	**AFM1+ LR**	**AFM1+ BT**	**AFM1+ LR + BT**
Alb (g/L)	3.45 ± 0.2	3.43± 0.3**	34.1 ± 0.3**	2.2 ± 0.3*	3.35 ± 0.4**	3.56 ± 0.6**	3.46 ± 0.3**
TP (g/L)	13.8 ± 0.6	13,9 ± 0.5**	14.1 ± 0.4**	10.9 ± 0.4*	12.9 ± 0.5**	11.2 ± 0.4**	14.1±0.3**
Chl (g/L)	112.0 ±5.8	111.9 ± 3.5**	111.4 ± 3.3**	91.1 ± 6.2*	110.1 ± 6.1**	109.1 ± 6.5**	111.1±5.5**
UA (mmol/L)	5.3 ± 0.6	5.6 ± 0.7**	5.7 ± 0.5**	4.1 ± 0.4*	5.3 ± 0.4**	4.9 ± 0.4**	5.4±0.5**

(*) : différence significative avec le groupe témoin, $p \leq 0,05$; moyenne±SD

(**) : différence non significative avec le groupe témoin $p \leq 0,05$; moyenne±SD

I.3. Détermination du statut oxydant/antioxydant au niveau du foie et du rein

I.3.1. Effets sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

La comparaison des valeurs moyennes de l'activité du SOD entre le lot témoin et les lots traités par la bactérie ou par l'argile au niveau du foie (Figure 26A) et du rein (Figure 26B) n'a pas montré des différences significatives. Par contre ces valeurs diminuent significativement dans le lot traité par l'AFM1 par rapport au lot témoin.

Les animaux traités simultanément par l'AFM1 combinée à l'argile et/ou à la bactérie ont montrés une augmentation significative de l'activité de SOD par rapport au lot traité par l'AFM1 seule. De plus, La combinaison simultanée de la LR et de la BT avec la mycotoxine a montré une amélioration plus significative par rapport au groupe traité à l'AFM1 combiné à LR ou à BT séparément.

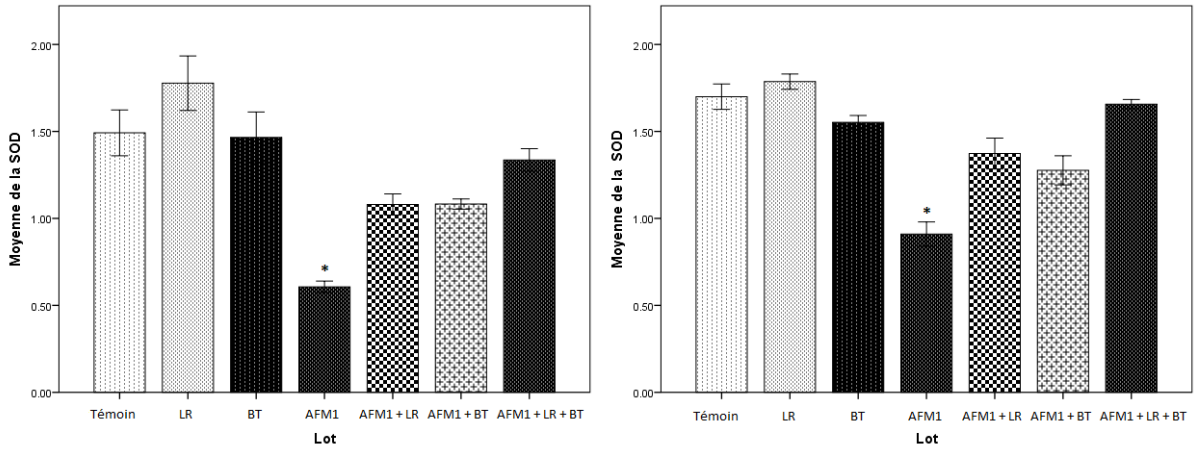


Figure 26: Activité de la SOD au niveau du foie (**A**) et du rein (**B**) des souris témoins, traitées par la LR (2.10^8 UFC/ml), BT (1 g/L), AFM1 (100 µg/kg p.c), AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT. (*) Significatives (P<0,05).

I.3.2. Effets sur l'activité de la catalase (CAT)

Les résultats présentés dans la figure 27 montrent que l'activité de la catalase n'a pas différé significativement entre les animaux témoins et ceux traités par l'argile ou la bactérie au niveau du foie (A) et du rein (B). En revanche, l'AFM1 a provoqué une diminution significative de cette activité. Le traitement des souris par l'AFM1 combinée à la LR et/ou la BT a amélioré significativement l'activité de la CAT par rapport aux animaux traités par l'AFM1 uniquement.

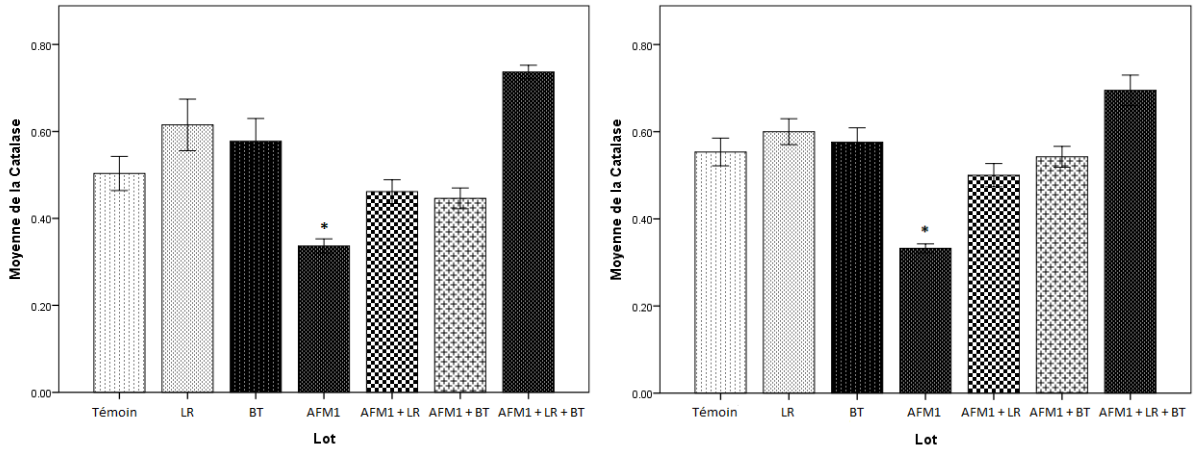
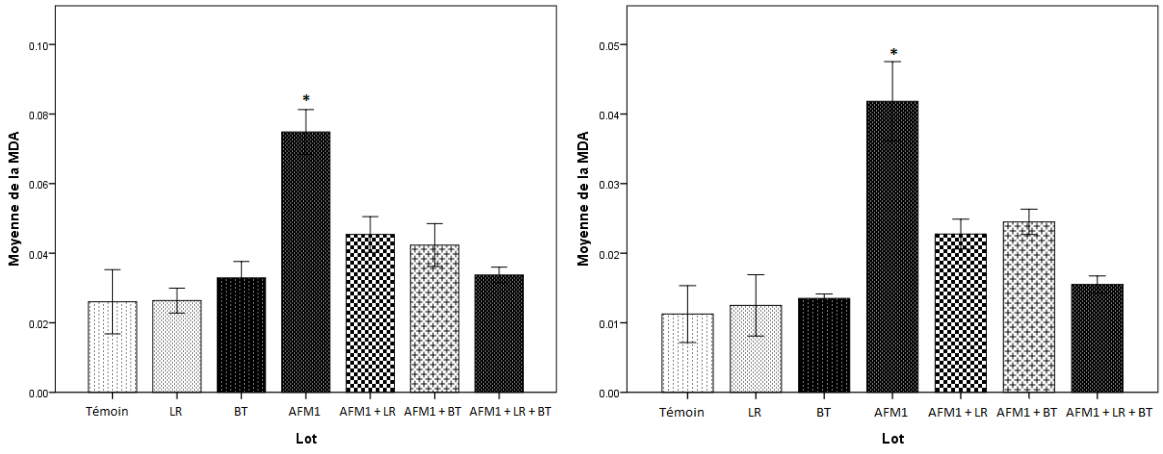


Figure 27: Activité de la catalase (CAT) au niveau du foie (**A**) et du rein (**B**) des souris témoins, traitées par la LR (2.10^8 UFC/ml), BT (1 g/L), AFM1 (100 µg/kg p.c), AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT. (*) Significatives (P<0,05).

I.3.3. Effets sur la teneur en malondialdéhyde (MDA)

Les résultats nous ont révélé une différence non significative en termes d'accumulation de MDA entre les souris témoins et celles traitées par l'argile ou la bactérie dans le foie et les reins (Figure 28A et 28B). Par contre les souris exposées à l'AFM1 ont montré une teneur hépatique et rénale élevée en MDA par rapport au témoin.

Le traitement combiné à l'argile et/ou à la bactérie a réussi d'induire une amélioration significative de la MDA dans le foie et les reins. Le traitement supplémenté en LR et/ou BT, a corrigé cette accumulation. En effet, on a noté une diminution significative des teneurs hépatiques et rénales en MDA chez les groupes traités par AFM1+BT, AFM1+LR et cette amélioration a été plus importante chez le lot exposé au mélange LR + BT avec l'AFM1.



A **B**

Figure 28: Taux d'accumulation du malondialdéhyde (MDA) au niveau du foie (**A**) et du rein (**B**) des souris témoins, traitées par la LR (2.10^8 UFC/ml), BT (1 g/L), AFM1 (100 µg/kg p.c), AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT. (*) Significatives (P<0,05).

I.3.4. Effets sur les teneurs en protéines sulfhydriles (PSH)

Les résultats de la figure 29A et 29B indiquent que l'exposition à l'AFM1 a entrainé une diminution significative des teneurs en PSH au niveau du foie (A) et du rein (B) par comparaison aux animaux du lot témoin, traité par la LR ou BT. Les individus traités simultanément par l'AFM1 + LR ou l'AFM1 + BT ont montré une augmentation significative des teneurs en PSH hépatique et rénale par rapport au lot exposé à l'AFM1 uniquement. Par ailleurs l'exposition à l'AFM1 combiné avec l'argile et la bactérie a montré une amélioration plus significative de teneurs en PSH par rapport à l'exposition séparée à l'AFM1 + LR ou à l'AFM1 + BT dans les deux organes.

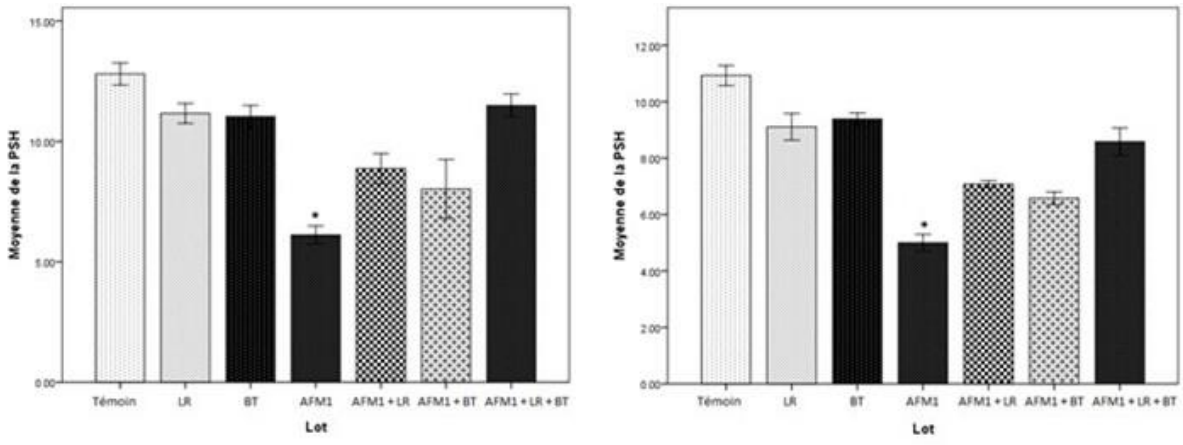


Figure 29: Teneurs en protéines thiols (µg/mg de protéines) au niveau du foie (**A**) et du rein (**B**) des souris témoins, traitées par la LR (2.10^8 UFC/ml), BT (1 g/L), AFM1 (100 µg/kg p.c), AFM1+LR, AFM1+BT et AFM1+LR +BT. (*) Significatives (P<0,05).

I.4. Effet sur l'Index splénique et l'index thymique

Le traitement par l'AFM1 a induit une augmentation de l'index splénique et une diminution de l'index thymique après un traitement de 10 j. Le co-traitement par l'AFM1 plus la LR et/ou l'argile a rétablie les valeurs des indexes étudiés qui sont retrouvées comparables à celles du groupe témoin (Figure 30).

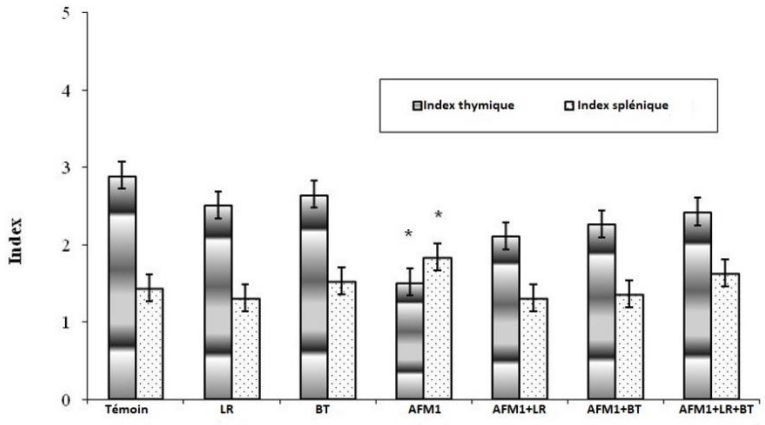


Figure 30: Effets du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur l'index splénique et l'index thymique des souris. (*) Significatives (P<0,05).

I.5. Effet sur la viabilité des thymocytes et des splénocytes

Les résultats de l'effet des différents traitements sur la viabilité des splénocytes et des thymocytes des souris sont présentés dans la figure 31. En effet, le traitement par l'AFM1 a diminué la viabilité des cellules de la rate chez les souris traitées par rapport aux souris témoins.

Cependant, un pourcentage de viabilité des splénocytes proche de la normale a été noté chez les souris traitées simultanément par les bactéries LR et/ou la BT et l'AFM1.

La viabilité des cellules thymiques a été réduite chez les souris traitées par l'AFM1 par rapport aux souris témoins. Chez les souris traitées par le mélange de LR et/ou la BT et l'AFM1 la viabilité des thymocytes n'a pas montré une différence significative par rapport à celle des souris témoins.

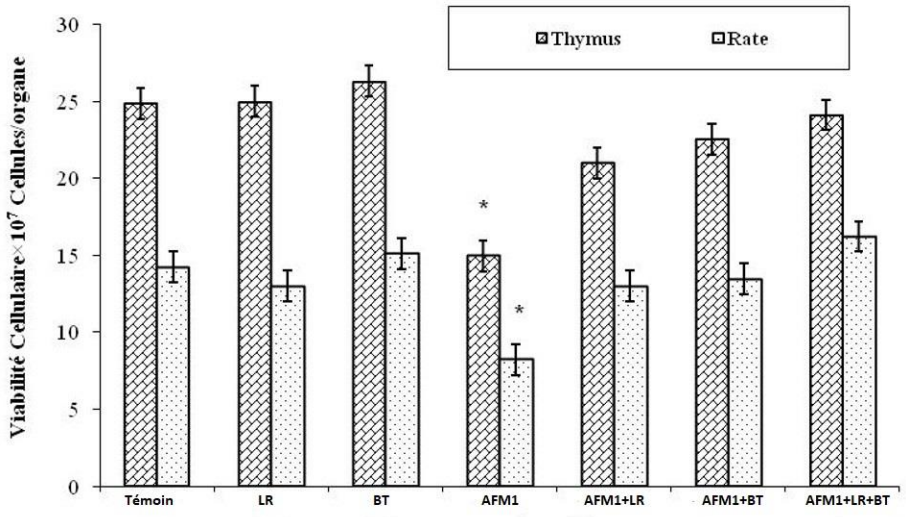


Figure 31: Effets du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur la viabilité des splénocytes et des thymocytes des souris. (*) Significatives (P<0,05).

I.6. Effet sur les sous-types de cellules immunitaires et sur le profil d'immunoglobulines

I.6.1. Analyse des sous-types de globules blancs

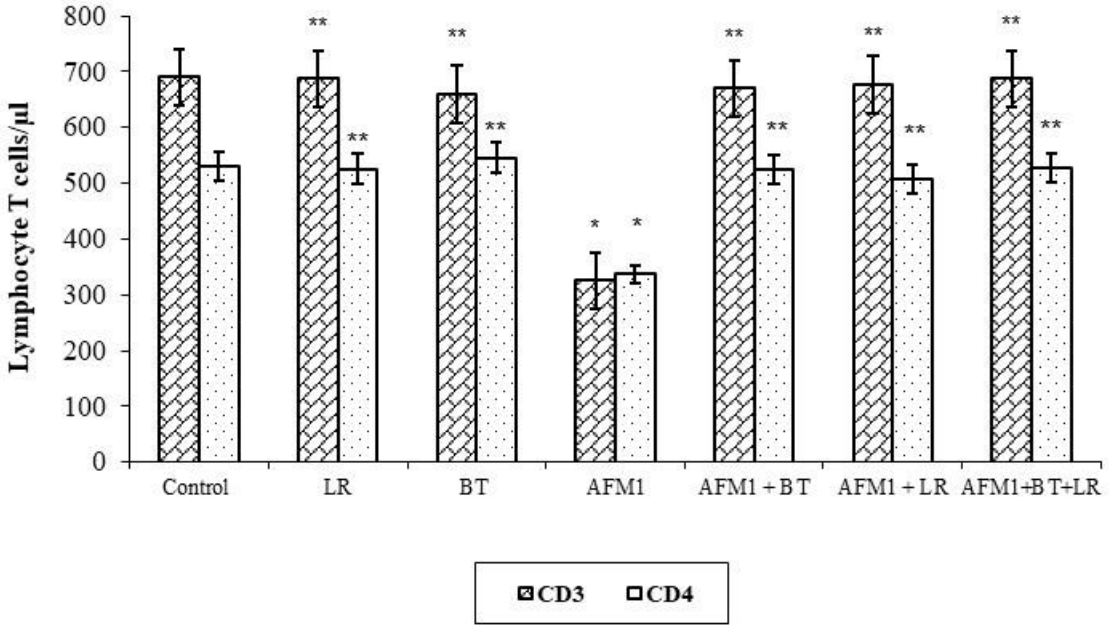
Les résultats concernant les sous-types de globules blancs totaux (tableau 21) ont révélé que le traitement par l'AFM1 seule a entraîné une modification significative du nombre de lymphocytes, de neutrophiles, de basophiles et de monocytes. La BT ou la LR seules n'ont pas induit de changements significatifs de ces paramètres sanguins. De plus, les souris traitées avec l'AFM1 supplémentée de BT et/ou de LR ont présenté des valeurs normales de sous-types de globules blancs.

Tableau 21: Effets du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur le nombre des sous-types des leucocytes. Les données indiquées sont des moyennes ± SD. (*) Significatives (P<0,05), (**) Non significatives (P<0,05).

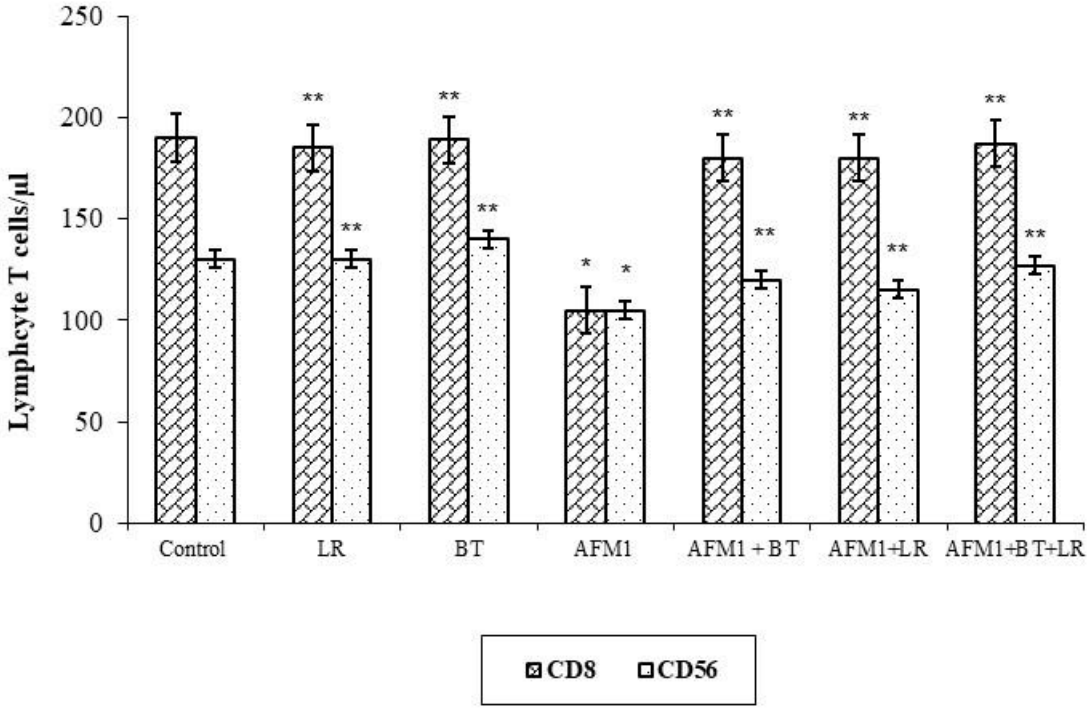
Paramètres cellulaires	Témoin	LR	BT	AFM1	AFM1+ LR	AFM1+ BT	AFM1+ LR + BT
Lymphocytes ($10^3/\mu l$)	9.10 ± 1.71	8.98 ± 1.62**	9.17 ± 1.49**	7.56 ± 1.97*	9.14 ± 1.55**	9.14 ± 1.79**	9.11 ± 1.49**
Neutrophiles ($10^3/\mu l$)	4.50 ± 0.67	4.51 ± 0.72**	4.49 ± 0.81**	3.16 ± 0.5*	4.49 ± 0.82**	4.46 ± 0.85**	4.52 ± 0.52**
Monocytes ($10^3/\mu l$)	1.22 ± 0.03	1.19 ± 0.04**	1.2 ± 0.09**	1.5 ± 0.09*	1.23 ± 0.07**	1.23 ± 0.07**	1.21 ± 0.06**
Eosinophiles ($10^3/\mu l$)	0,3 ± 0,06	0.4 ± 0.12**	0.5 ± 0.12**	0.3 ± 0.02**	0.4 ± 0.03**	0.4 ± 0.03**	0.3 ± 0.02**
Basophiles ($10^3/\mu l$)	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.04**	0.17 ± 0.03**	0.05 ± 0.02*	0.14 ± 0.03**	0.06 ± 0.03**	0.19 ± 0.02**

I.6.2. Effet sur le nombre des lymphocytes

L'étude de l'effet du traitement à l'AFM1 sur le nombre des lymphocytes T sériques a révélé des dommages sévères au système immunitaire illustrés par la diminution significative du nombre de CD3 +, CD4 +, CD8 + et CD56 + (Figure 32A et 32B). Le traitement par la BT et la LR n'a pas modifié les taux de lymphocytes T dans le sang. Le traitement par l'AFM1 plus la BT et/ou la LR a induit une amélioration significative du nombre total de cellules du système immunitaire (60%) par rapport au groupe témoin, bien qu'il soit toujours différent des valeurs de contrôle.



A



B

Figure 32: Effet du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur les pourcentages de lymphocytes T dans le sang, CD3+, CD4+ (A) et CD8+, CD56+ (B). Les données indiquées sont des moyennes ± SD. (*) Significatives (P<0,05), (**) Non significatives (P<0,05).

I.6.3. Effet sur le profil des immunoglobulines

Les données de la figure 33 représentent la réponse immunitaire humorale (immunoglobulines Ig G et Ig A) en réponse aux différents traitements suggérés. Ces résultats indiquent clairement que le traitement par l'AFM1 seule a entraîné une diminution significative des taux d'immunoglobulines Ig G et Ig A. Alors que le traitement par la BT ou la LR seules n'a pas changé significativement le profil de ces Immunoglobulines. De plus, chez les sujets traités par l'AFM1 combinée à la BT et/ou à la LR le profil immunitaire humoral est trouvé comparable à celui des sujets témoins.

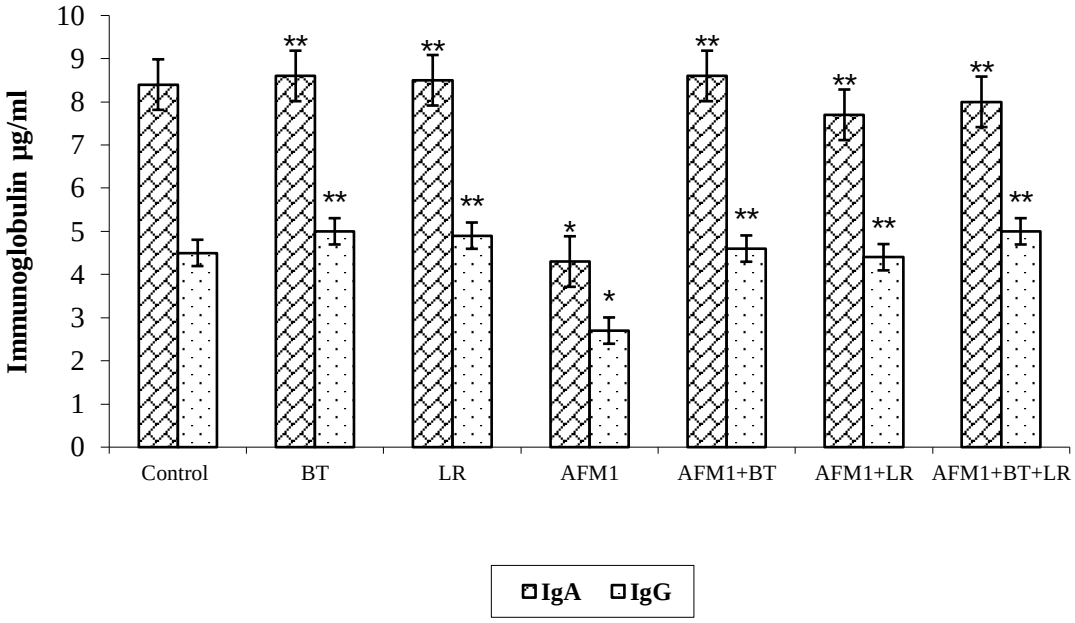


Figure 33: Effet du traitement par l'AFM1 (100 µg/kg p.c), la LR (2.10^8 UFC/ml), la BT (1 g/L), AFM1 + LR, AFM1 + BT et AFM1 + LR + BT sur les concentrations sériques d'IgG et d'IgA chez les souris. Les données présentées sont des moyennes ± SD. (*) Significative (P<0,05), (**) non significative (P<0,05).

I.7. Étude histologique du foie et du rein

L'étude histologique du foie (Figure 34) indique que le traitement des souris par l'AFM1 a induit des pathologies vasculaires ainsi qu'une dilatation de la veine Centro-lobulaire avec apparition des foyers inflammatoires. De plus, on a noté une augmentation du nombre des cellules de kuppfer, des vacuolisations et des infiltrations lymphocytaires. Le traitement des souris par la LR ou la BT a montré une structure histologique normale comparable à celle des sujets témoins avec des hépatocytes d'aspect normal, des capillaires sanguins sinusoïdes et une veine centro-lobulaire intacte. Donc, le traitement pendant 10 jours à la LR ou à la BT n'a pas

modifié la structure histologique du foie. Toutefois, la structure histologique des foies des souris recevant le co-traitement ; AFM1+LR ou AFM1+BT a montré une diminution des effets toxiques de l'AFM1. En outre, pour le groupe traité par le mélange AFM1+BT+LR, les structures hépatiques se trouvent comparables à celles des sujets témoins.

Au niveau du rein (Figure 35), le traitement des souris par l'AFM1 à la dose de 100 mg/kg p.c pendant 10 jours a provoqué des congestions, des infiltrations lymphocytaires, une hypertrophie glomérulaire, une hypertrophie de l'appareil juxta-glomérulaire, une dilatation des tubes contournés distaux, une hémorragie ainsi qu'une accumulation des gouttelettes lipidiques. Toutefois, la structure des reins chez les souris traitées par la LR seule ou la BT seule montre un aspect normal par comparaison avec les témoins. Le co-traitement par l'AFM1 avec LR ou bien avec BT a prévenu considérablement les effets néphrotoxiques de cette mycotoxine. Il est de même pour le groupe traité simultanément par l'AFM1, la LR et la BT dont l'histologie rénale a montré un aspect comparable à celui du groupe témoin.

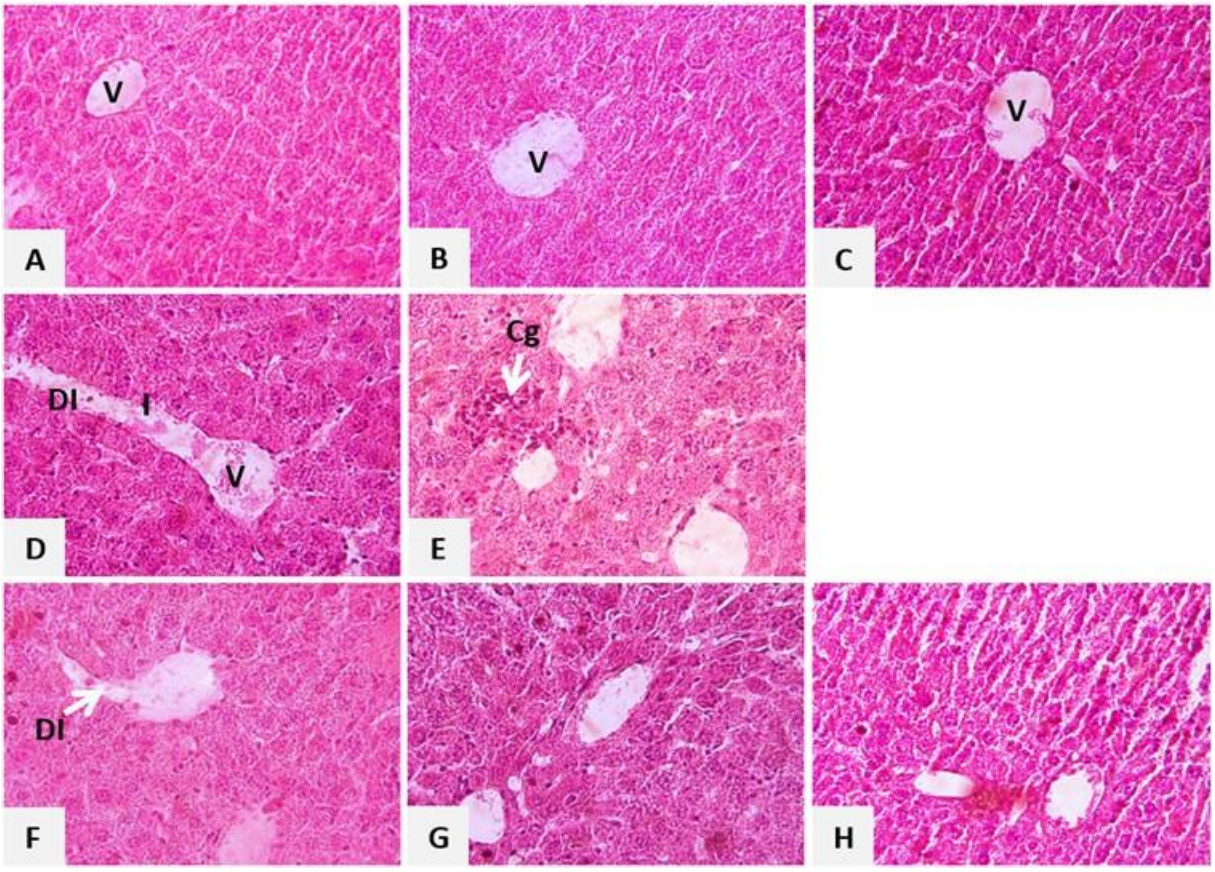


Figure 34: Observation microscopique du tissu hépatique des souris témoins (A), exposées à la LR (2.10^8 UFC/ml) (B), à la BT (1 g/l) (C), à l'AFM1 (100 µg/kg p.c) (D et E) et aux mélanges AFM1+ LR (F), AFM1+BT(G) et AFM1+LR+BT(H) pendant 10 jours (HE, G×40). (V : veine Centro-lobulaire, I : infiltration lymphocytaire, Cg : Congestion).

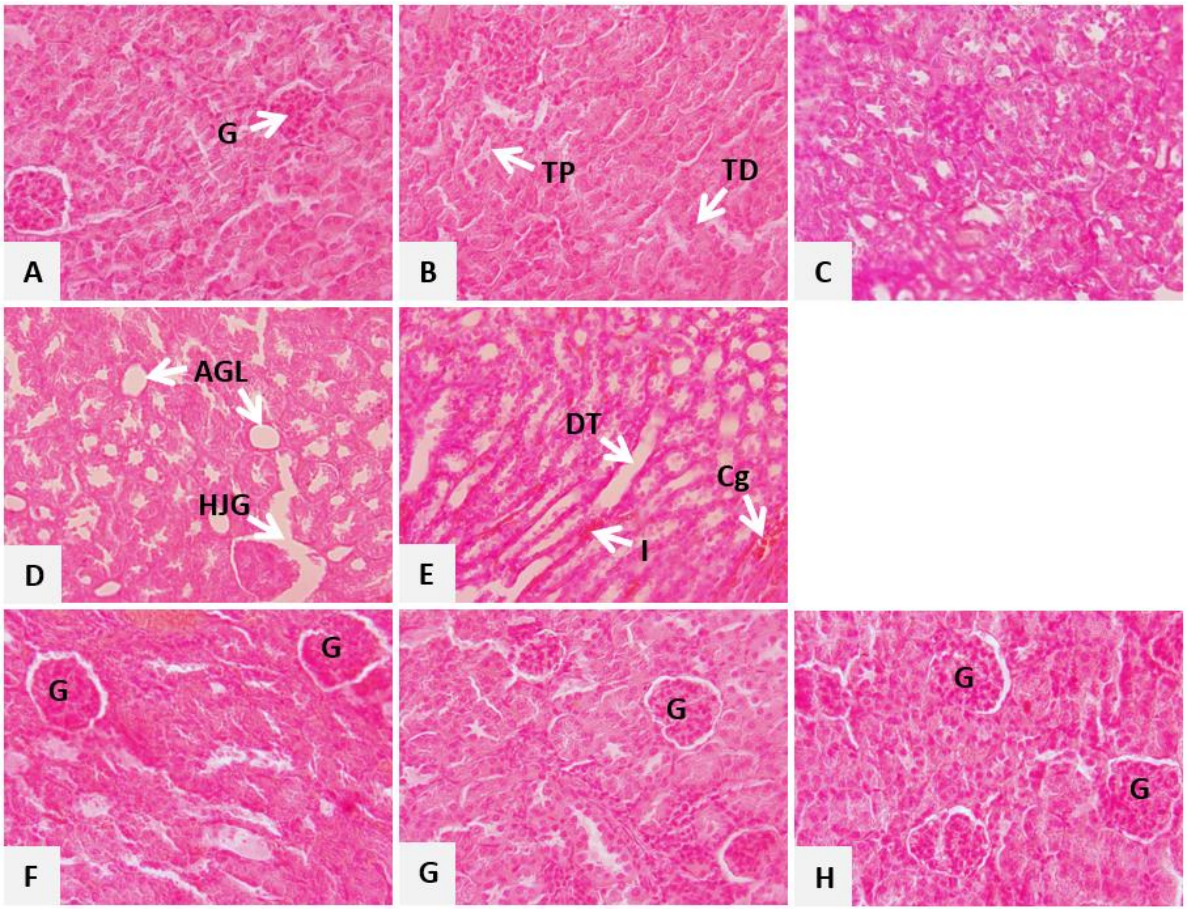


Figure 35: Observation microscopique du tissu rénal des souris témoins (A), exposées à la LR (2.10^8 UFC/ml)(B), à la BT (1g/l) (C), à l'AFM1 (100 µg/kg p.c) (D et E) et aux mélanges AFM1+LR (F), AFM1+BT(G) et AFM1+LR+BT(H) pendant 10 jours (HE, G×40). (G : Glomérule, HJG : Hypertrophie de l'appareil juxta-glomérulaire, TP : Tube contourné proximal, TD : Tube contourné distal, Cg : Congestion, I : Infiltration lymphocytaire, DT : dilatation tubulaire, AGL : accumulation des gouttelettes de lipides).

II. Pouvoir préventif de *Lactobacillus plantarum* MON03 vis-à-vis la reprotoxicité de l'AFB1 et la ZEN *in vivo*

L'étude *in vivo* a été menée à l'aide des souris Balb/c mâles traitées, par voie orale, par l'AFB1+ZEN seules ou en association avec LP et/ou BT, quotidiennement pendant 20 jours, comme suit : groupe 1 témoin, groupe 2 traité par L'AFB1+ZEN, groupe 3 co-traité par AFB1+ZEN+LP, groupe 4 co-traité avec AFB1+ZEN+BT et groupe 5 co-traité avec AFB1+ZEN+BT+LP. Les concentrations choisies (Abbès et al., 2012a; Jebali et al., 2018) sont : $2*10^9$ UFC/m = 2 mg/kg p.c pour la LP, 1 g/Kg p.c pour la BT, 40 mg/Kg p.c pour la ZEN et 100 µg/Kg p.c pour l'AFB1.

II.1. Étude de la toxicité générale

Les signes de toxicité d'ordre général ont été enregistrés tout au long de la période de traitement.

II.1.1. Effet sur la létalité

Pendant la période du traitement, on a noté la mort d'une souris co-traitée par l'AFB1 et la ZEN et les souris sont apparues cliniquement anormales. Des troubles de comportement et de mouvement et une perte d'appétit remarquable ont été signalés. Alors que les souris co-traitées par les 2 mycotoxines avec le mélange (LP+BT) n'ont pas montré aucun signe de toxicité.

II.1.2. Effet sur le gain de poids

À la fin de la période du traitement, les souris traitées par les 2 mycotoxines avec le mélange LP+BT ont augmenté de poids par rapport à leurs poids initiaux. En revanche chez les souris traitées avec les deux mycotoxines et les souris co-traitées avec les toxines + LP et/ou BT, on a observé une perte de poids (Figure 36).

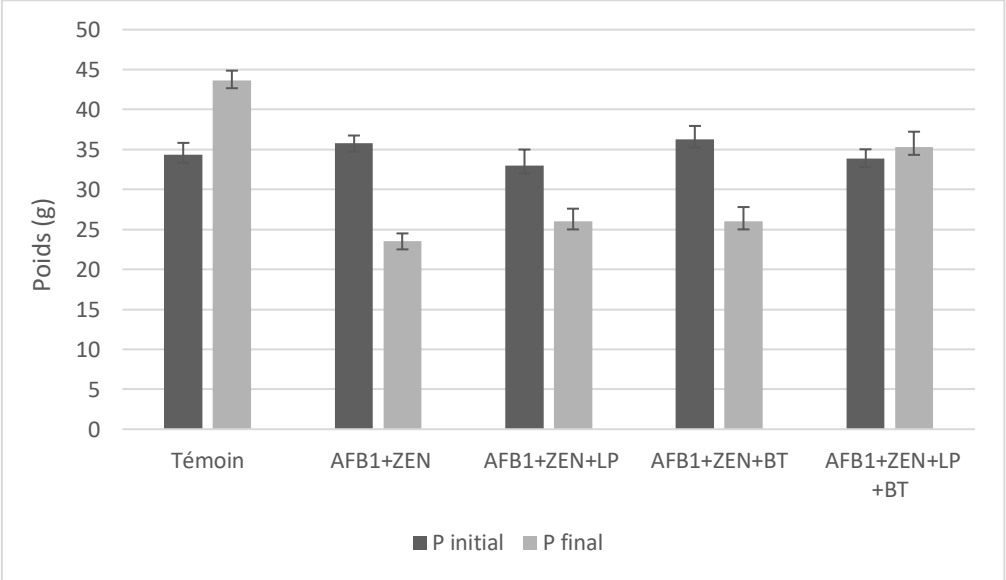


Figure 36: Effet du traitement par l'AFB1 (100 µg/kg p.c) + la ZEN (40 mg/kg p.c) seules ou en association avec la LP (2.10^9 UFC/ml) et/ou la BT (1 g/L) sur le poids des souris Balb/c.

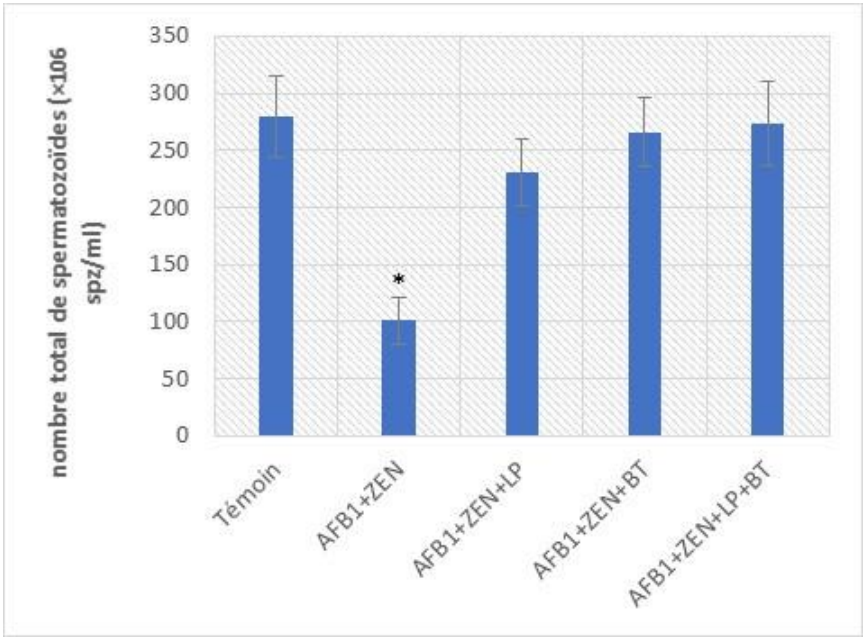
II.2. Effet sur la Concentration, la viabilité, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes

Les figures 37A, 37B et 37C représentent l'effet des différents traitements sur la concentration, la viabilité et la mobilité des spzs des souris. Le groupe traité par les deux mycotoxines (AFB1 et ZEN) seules a montré une diminution significative de la concentration des spzs par rapport à celle du groupe témoin. En revanche, chez les souris traitées par les mycotoxines associées à la BT ou au mélange BT+LP, on a noté des concentrations de spzs proches de la normale.

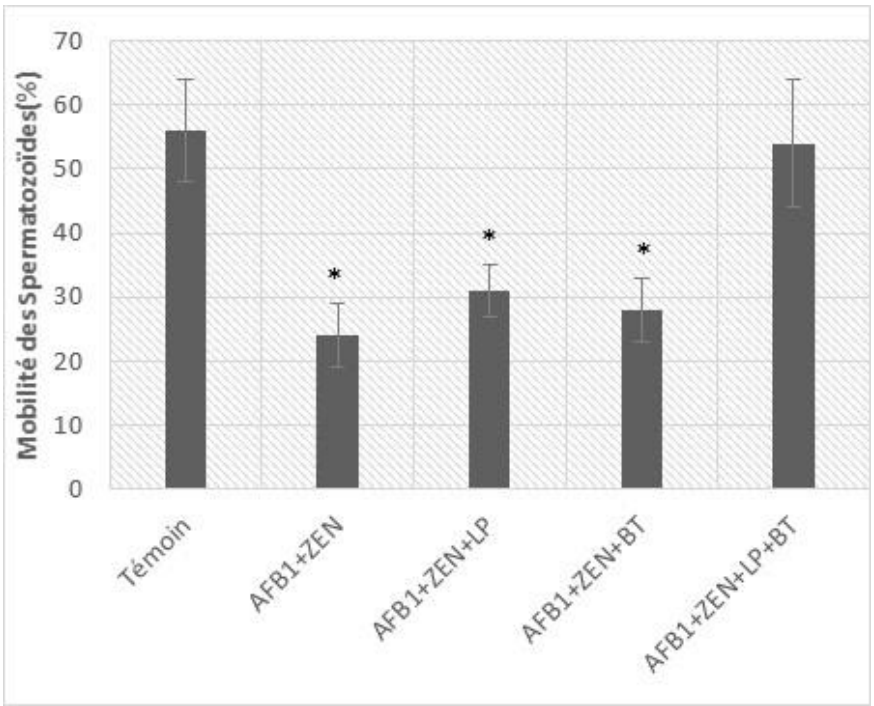
Concernant la mobilité des spzs, nos résultats ont montré que chez les souris traitées

avec les mycotoxines seules ou combinées avec la LP ou la BT, le pourcentage de mobilité des spzs était abaissé par rapport au groupe témoin. Les souris co-traitées avec les deux toxines et le mélange (LP+BT) ont montré une mobilité similaire à celle des souris témoins, suggérant un effet préventif de ce mélange contre la toxicité des mycotoxines utilisées.

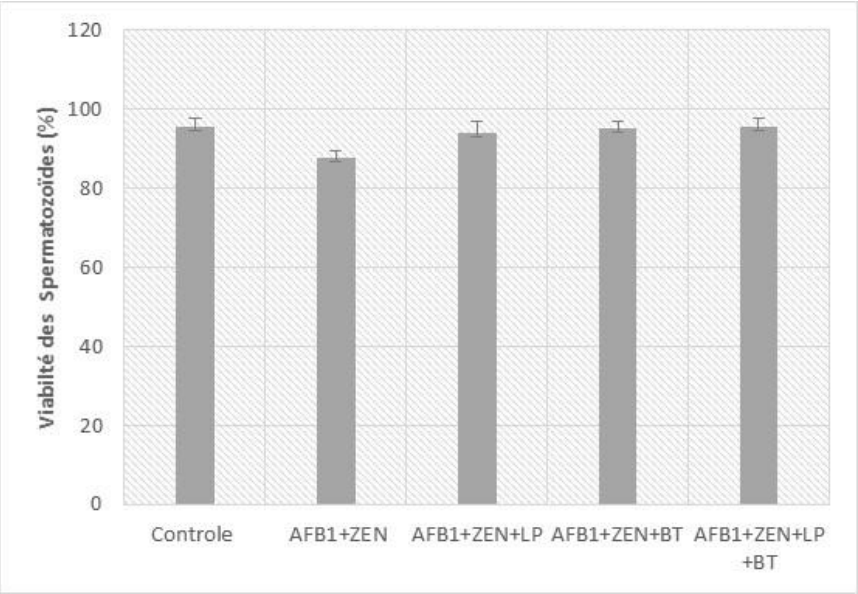
La figure 37 C montre une réduction non significative de la viabilité des spzs chez les souris traitées par les deux mycotoxines. L'administration de la LP et/ou de la BT avec l'AFB1 et la ZEN a montré un taux de viabilité des spzs proche de la normale (95%).



A



B



C

Figure 37: Effet du traitement par l'AFB1 (100 µg/kg p.c) + la ZEN (40 mg/kg p.c) seules ou en association avec la LP (2.10^9 UFC/ml) et/ou la BT (1 g/L) sur la concentration (**A**), la mobilité (**B**) et de la viabilité (**C**) des spermatozoïdes chez les souris.

La figure 38 illustre les résultats de l'étude da la morphologie des spzs épididymaires. Le traitement à l'AFB1 et à la ZEN seules a modifié significativement la morphologie des spzs par rapport à celle des spzs témoins (62% anomalie de la queue et 20% anomalie de la tête). La combinaison des mycotoxines avec la LR ou la BT séparées ou combinées a montré une amélioration des malformations induites par l'AFB1 et la ZEN mais, tout en restant élevées par rapport aux spzs témoins.

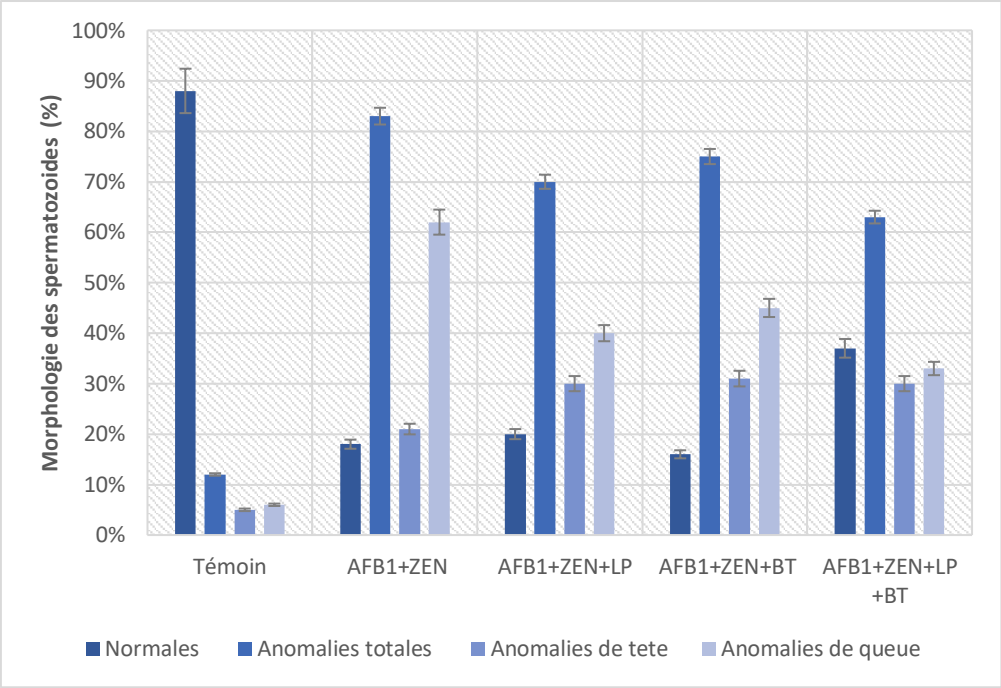


Figure 38: Effet du traitement par l'AFB1 (100 µg/kg p.c) + la ZEN (40 mg/kg p.c) seules ou en association avec la LP (2.10^9 UFC/ml) et/ou la BT (1 g/L) sur la morphologie des spermatozoïdes : normale, anomalies totales, anomalies de la tête et anomalies de la queue.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les céréales sont les plus fréquemment contaminées par les mycotoxines. Ceci soulève un problème d'ordre mondial qui touche la sécurité sanitaire et la qualité des denrées alimentaires. En Tunisie, le blé dur est un aliment de base pour la population et la céréale la plus cultivée (Bensassi et al., 2010). De plus, la Tunisie en raison de son climat chaud et humide, de sa position géographique et des conditions socio-économiques de sa population, constitue un foyer favorable à la prolifération fongique et à la toxinogenèse. Ces toxines sont produites à différentes étapes de la chaine alimentaire, pendant la croissance des plantes (au champ), lors de la récolte et pendant la post-récolte (pré-stockage, stockage et transformation des aliments) (Cotty and Jaime-Garcia 2007 ; Rogowska et al., 2019). Ces toxines peuvent provoquer des effets néfastes pour l'homme et l'animal comme la cancérogenèse, l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, l'immunomodulation et la neurotoxicité (Ozden et al., 2012; Paterson and Lima 2010; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002; Wu 2006). Ainsi, le développement d'alternatives efficaces pour limiter la contamination des cultures par les mycotoxines et prévenir leurs mycotoxicoses est aujourd'hui une préoccupation internationale majeure.

De ce fait, nous nous sommes intéressés à étudier la prévalence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie et leur décontamination biologique. Cette dernière correspond à utiliser les bactéries lactiques et l'argile de type bentonite dans la détoxification des principales mycotoxines contaminant le blé tunisien comme l'AFB1 et son métabolite l'AFM1, la ZEN et l'OTA.

Ainsi, on a initié le travail par l'occurrence de 22 mycotoxines dans 136 échantillons de blé dur collectés en Tunisie en 2020 (46) et en 2021 (90) dans deux régions climatiques différentes (continentale et littorale). L'occurrence a été étudiée au champ, à la récolte, au pré-stockage et au stockage et l'exposition alimentaire du consommateur tunisien aux mycotoxines a été évaluée. L'activité de l'eau et la teneur en eau de tous les échantillons de blé ont également été déterminées.

En 2020, 60,9% des échantillons prélevés ont été contaminés par l'AFB1 et/ou les ENs. L'AFB1 n'a été détectée que dans 6 échantillons, pré-stockés ou stockés, de la région continentale avec des concentrations dépassant la limite européenne (2 µg/kg). De plus, les ENs (ENA, ENB et ENB1) ont été détectées dans tous les échantillons de la filière de blé dur des deux régions continentale et littorale. En 2021, 34,4% des échantillons ont été contaminés par des ENs seulement (ENA, ENB et ENB1). Ils ont été tous des échantillons de récolte collectés dans la région littorale, sauf un seul qui a été de pré-stockage. Au cours des deux années

d'échantillonnage, l'ENB a été la mycotoxine la plus fréquemment trouvée, suivie par l'ENB1 et l'ENA1.

La présence d'aflatoxines dans des échantillons de blé tunisien a été mentionnée par d'autres études. Ghali et al. (2008) ont signalé que 29,4 % (15/51) des échantillons de blé et de produits dérivés collectés sur des marchés et des réserves familiales en Tunisie étaient contaminés par des AFs à des concentrations variant de 4 à 12,9 µg/kg avec 7,8% des échantillons étaient contaminés par l'AFB1 (fourchette : 1,1 à 3,4 µg/kg ; moyenne : 2,2 µg/kg). De même, Ghali et al. (2010) ont rapporté que 8,7% (4/46) des échantillons de grains de blé et de produits dérivés collectés sur les marchés tunisiens étaient contaminés par des AFs à des concentrations comprises entre 0,15 et 18,6 µg/kg avec l'AFB1qui était présente dans tous les échantillons contaminés (fourchette : 0,12 à 18 µg/kg). En revanche, Oueslati et al. (2012) n'ont pas détecté l'AFB1 dans 34 échantillons de blé collectés sur les marchés et dans les magasins de Tunis.

Dans la présente étude, les aflatoxines autres que l'AFB1 n'ont pas été détectées dans les échantillons de blé, tandis qu' Oueslati et al. (2012) ont détecté l'AFG2 dans 4 sur 34 échantillons de grains de blé collectés (fourchette : 5,2-8,7 µg/kg ; moyenne : 6,6 µg/kg). Ghali et al. (2010) ont rapporté que sur 46 échantillons de grains de blé et de produits dérivés, un seul était contaminé par l'AFG1 à une concentration de 0,13 µg/kg et 8,6 % (4/46) étaient contaminés par l'AFB2 (fourchette : < LOQ-0,3).

Des études conduites dans d'autres pays du Maghreb ont signalé la présence d'AFs dans des échantillons de blé et produits dérivés. Zinedine et al. (2007) ont indiqué que 17,6% de la farine de blé prélevée sur des marchés marocains était contaminé par l'AFB1 (fourchette : 0,03 à 0,15 µg/kg ; moyenne : 0,07 µg/kg) tandis que Hathout et al. (2020) ont détecté l'AFB1 dans 33,3 % (12/36) des échantillons de grains de blé provenant de 4 gouvernorats égyptiens (fourchette : 0,05-62,17 µg/kg).

Riba et al. (2010) ont rapporté que 60,7% (17/28) des échantillons de blé collectés au champ dans deux régions climatiques d'Algérie ont été contaminés par l'AFB1 à des concentrations qui varie entre 0,22 et 13,96 µg/kg. En plus, ils ont montré la présence d'AFB1 dans 64,7% (11/17) des échantillons de blé stockés avec des concentrations allant de 0,13 à 37,42 µg/kg et la concentration la plus élevée d'AFB1 (37,42 µg/kg) a été retrouvée dans un échantillon de blé stocké pendant 12 mois.

Les concentrations en AFB1 analysées dans la présente étude étaient inférieures à celles observées dans les grains de sorgho récoltés sur les marchés tunisiens (incidence : 66.6%,

fourchette : 14,4-79,9 µg/kg, moyenne : 46,7 µg/kg) (Oueslati et al., 2012). En revanche, elles sont plus élevées que celles observées par Lahouar et al. (2018), qui ont détecté l'AFB1 avec une forte incidence dans 59,5 % (22/37) des échantillons de grains de sorgho prélevés sur les marchés tunisiens (fourchette : 0,03-9,48 µg/kg, moyenne : 1,24 µg/kg) avec 6 échantillons (16,2 %) dépassant la limite européenne (2 µg/kg). Les concentrations en AFB1 sont également supérieures à celles signalées par Ghali et al. (2010), qui ont détecté l'AFB1 dans 73,4 % (36/49) du sorgho et des produits dérivés (fourchette : 0,4-25,1 µg/kg), dans un échantillon sur 17 de maïs et des produits dérivés (0,42 µg/kg) et dans 8,3 % (2/24) de l'orge et des produits dérivés (fourchette : 0,4-0,5 µg/kg). La concentration en AFB1 dans les échantillons d'orge et des produits dérivés collectés par Ghali et al. (2008) (12 %, fourchette : 1,6-50 µg/kg, moyenne : 18,4 µg/kg) était supérieure à celle observée dans la présente étude. En comparaison avec d'autres céréales tunisiennes stockées, Jedidi et al. (2017) ont détecté une concentration élevée de 51,18 µg/kg d'AFB1 dans un échantillon de maïs stocké.

En ce qui concerne les ENs, Chakroun et al. (2022), ont détecté l'ENB1 dans tous les échantillons de grains de blé (23) collectés à la récolte en 2017 (13) et en 2018 (10) dans la région de Béja en Tunisie. Les concentrations variait de 26000 à 47000 µg/kg en 2017 (moyenne : 33000 µg/kg) et de 26000 à 77000 µg/kg en 2018 (moyenne : 43000 µg/kg). Ces concentrations sont plus élevées que celles trouvées dans la présente étude. En plus, les échantillons collectés durant les deux années ont été contaminés par l'ENA (fourchette : <LOQ-716 mg/kg, moyenne : 549 mg/kg en 2017) et (fourchette : <LOQ-930 mg/kg, moyenne : 930 mg/kg en 2018) qui est non trouvée dans la présente étude. Oueslati et al. (2011) ont rapporté la présence des ENA1, ENB et ENB1 dans tous les échantillons de blé collectés des supermarchés tunisiens (13), avec des concentrations moyennes de 90000, 75000 et 30000 µg/kg, respectivement, et ces concentrations sont plus élevées que celle trouvée dans nos résultats. Bien que les échantillons de cette étude aient également été contaminés par l'ENA à une concentration moyenne de 48000 µg/kg cette mycotoxine n'a pas été détectée dans notre étude.

Dans une étude réalisée par Mahdjoubi et al. (2020), 30 échantillons de blé collectés sur différents marchés algériens dans trois régions de l'ouest du pays étaient contaminés par l'ENA1 (46,7 %, fourchette : 4 à 395 µg/kg, moyenne : 107 µg/kg), ENB (60 %, plage : 1,2 à 5288 µg/kg, moyenne : 1668 µg/kg) et l'ENB1 (70 %, fourchette : 19,5 à 4569 µg/k, moyenne : 469 µg/kg). Par rapport aux échantillons de la présente étude, Ces échantillons étaient moins contaminés par l'ENA1 et l'ENB et plus contaminés par l'ENB1.

Dans une autre étude réalisée par Oueslati et al. (2011) sur d'autres céréales tunisiennes (orge, maïs et sorgho) et sur leurs produits dérivés, les concentrations en enniatines étaient beaucoup plus élevées que dans la présente étude. Elles ont été observées dans 80% des échantillons d'orge (4/5) (moyenne : 116000 µg/kg pour ENA1, 27000 µg/kg pour ENB et 31000 µg/kg pour ENB1), 66,6% de maïs (2/3) (moyenne : 29000 µg/kg pour ENA1, 17000 µg/kg pour ENB1 et 100% (3/3) de sorgho (moyenne : 370000 µg/kg pour ENA1, 72000 µg/kg pour ENB1).

Juan et al. (2017) ont montré que l'ENA était l'enniatine la plus fréquente (16%) dans les échantillons d'orge avec des concentrations qui varient de 30,6 à 287,1 µg/kg (moyenne : 96,4 µg/kg), tandis que 10% des échantillons ont été contaminés par d'autres enniatines : l'ENA1 (fourchette : 40,5-220,3 µg/kg, moyenne : 100,5 µg/kg), l'ENB (fourchette : 107,3-184,6 µg/kg, moyenne : 158,8) et l'ENB1 (fourchette : 112,4-162,7 µg/kg, moyenne : 129,2 µg/kg).

Des échantillons de blé prélevés sur différents marchés marocains, étaient moins contaminés par les enniatines (fourchette : 2,5 - 2570 µg/kg) que les échantillons de la présente étude. Blesa et al. (2014) ont trouvé, conformément à nos résultats, que l'ENB était la mycotoxine la plus fréquente au niveau des échantillons de blé prélevés (61% des 80).

Cette étude montre qu'un seul échantillon de blé peut être contaminé par plusieurs mycotoxines. Oueslati et al. (2011) ont rapporté que 38 des 51 échantillons de céréales tunisiennes (blé, orge, maïs et sorgho) étaient contaminés par au moins deux enniatines différentes (ENA, ENA, ENB, ENB1) et que 11,7% des échantillons étaient contaminés par les quatre enniatines. Au Maroc, Blesa et al. (2014) ont trouvé que 41 des 80 échantillons de blé contenaient plus d'une mycotoxine de *Fusarium* (enniatines, BEA, DON), et que la co-occurrence des 4 enniatines était fréquemment détectée. Contrairement à nos résultats, Mahdjoubi et al. (2020) n'ont trouvé aucune co-occurrence d'ENs et d'AFs dans les échantillons de blé collectés sur différents marchés algériens.

L'effet toxique de la multicontamination peut varier selon le nombre de mycotoxines, leur structure, et leur interaction. La multi-production des mycotoxines dépend des champignons producteurs, de la nature du substrat et des conditions environnementales (Uhlig et al., 2006). Plusieurs mycotoxines de *Fusarium* sont souvent trouvées dans les céréales. Lu et al. (2013) ont utilisé le test MTT pour évaluer la cytotoxicité de mycotoxines individuelles (ENA, ENA1, ENB et ENB1) et de leurs combinaisons dans les cellules CHO-. Ils ont conclu que les interactions entre les enniatines se produisent de manière proportionnelle à la dose : les

combinaisons binaires ENA + ENB1, ENA1 + ENB et ENB + ENB1 ont montré un effet additif à n'importe quelle dose. À une concentration plus élevée, des effets synergiques ont été observés avec une combinaison binaire et tertiaire d'enniatines (ENA+ENA1, ENA+ENB, ENA1+ENB1, ENA+ENA1+ENB, ENA+ENA1+ENB1, ENA+ENB+ENB1 et ENA1+ENB1), alors que des effets antagonistes peuvent se produire à des concentrations plus faibles pour les combinaisons ENA+ENA1+ENB1 et ENA1+ENB+ENB1 après 24, 48 et 72 heures d'exposition.

L'activité et la teneur en eau des échantillons de blé collectés ont été étudiées et tous les échantillons avaient une a_w inférieure à 0,7 (fourchette : 0,41 à 0,67). La plupart des échantillons (124/136) avaient une a_w inférieure à 0,6 indiquant que l'eau libre nécessaire à la croissance fongique et à la production de mycotoxines n'était pas disponible. Par conséquent, la présence de mycotoxines dans les échantillons de blé de cette étude est le résultat d'autres facteurs favorisant l'infection fongique et la production de mycotoxines. Ceci est expliqué par le fait que les mycotoxines sont généralement stables, même pendant de longues périodes de stockage (Perdoncini et al., 2020). La prolifération des champignons et la production de mycotoxines dans les cultures peuvent être influencées par les conditions climatiques, les pratiques agricoles, y compris la rotation des cultures, la gestion des résidus, le labour, l'irrigation, la fertilisation et l'application de pesticides, ainsi que les conditions de stockage (Awuchi et al., 2021; Babalola et al., 2022; Hoffmans et al., 2022).

Au champ tous les échantillons collectés, en 2020 dans la région continentale, ont été trouvés contaminés par des mycotoxines. Cependant, aucune mycotoxine n'a été détectée dans la même région en 2021. Pour la plupart des échantillons prélevés en 2020 (9/10), les pratiques culturales ne comprenaient pas la rotation des cultures, la fertilisation et l'application de fongicides et d'insecticides. Par contre, la plupart des échantillons prélevés en 2021 (18/20) ont été traités avec les deux types de pesticides. De même, la rotation des cultures a été pratiquée et la fertilisation a été appliquée pour tous ces échantillons. Au moment de la récolte en 2020 et dans la région côtière, seulement 26,7% des échantillons étaient contaminés par des mycotoxines, alors qu'en 2021, tous les échantillons étaient contaminés.

Au pré-stockage, tous les échantillons de la région continentale et 54,5% des échantillons de la région littorale ont été contaminés. Dans la région continentale, les agriculteurs n'ont pas appliqué de fongicide pendant la culture, mais dans la région littorale ils l'ont fait pour 72,7% des échantillons. Tous les échantillons qui n'ont pas été traités avec du fongicide ont été infectés.

Au stockage, en 2020 dans la région continentale, les agriculteurs n'ont pas traité le blé avec des fongicides, ainsi tous les échantillons ont été contaminés. De plus, il n'existe pas de pratiques d'hygiène, comme l'élimination des résidus de culture de la récolte précédente ou des résidus de culture contaminés, pour éviter la détérioration des graines pendant l'entreposage. En effet, les procédures de nettoyage peuvent réduire la charge fongique avant le stockage. L'effet du nettoyage du blé et du maïs a été étudié par diverses études, comme récemment examiné par (Schaarschmidt and Fauhl-Hassek 2018, 2021). Les résultats ont montré que cette procédure est très importante dans la diminution de la charge fongique et ainsi dans la réduction de la toxinogenèse.

Ainsi, la présence de mycotoxines dans les graines de blé tunisien était le résultat des conditions climatiques et des pratiques culturales des agriculteurs. Des études ont mis en évidence que la production de mycotoxines est influencée par la répartition géographique, les conditions climatiques et les pratiques culturales des agriculteurs (Hell et al., 2008; Miraglia et al., 2009; Sanchis and Magan 2004).

Les études effectuées sur les mycotoxines dans les aliments sont réalisées pour évaluer leurs niveaux de contamination et le comparer aux limites fixées par les réglementations internationales. L'exposition humaine aux mycotoxines se fait surtout par la chaîne alimentaire, et des données analytiques pourraient être utilisées pour déterminer le risque pour la santé. En évaluant l'apport quotidien probable (PDI) de la population tunisienne, les chercheurs ont pu évaluer le risque associé à l'ingestion de mycotoxines dans les échantillons. En Tunisie, la consommation de blé était de 717 g/habitant/jour (Ayed et al., 2021) pour la population adulte totale (70 kg de poids corporel). En outre, les données sur l'évaluation de l'exposition de la population tunisienne à l'AFB1 et aux enniatines provenant de la consommation de blé sont estimées pour la première fois dans la présente étude. Nos résultats ont montré que les échantillons de blé collectés se sont avérés une source importante d'exposition à l'AFB1 dans la population tunisienne.

Le résultat de la PDI en AFB1 est inférieur à celui obtenu dans le riz (48,9 ng/kg pc/jour) pour la population tunisienne par Serrano et al. (2012). À des fins de comparaison, il n'y avait pas une dose journalière acceptable (DJA) pour les aflatoxines. Les comités internationaux d'experts ne fournissent pas de DJA numérique, car ces substances sont cancérigènes (FAO/OMS, 2001). Ainsi, les niveaux d'aflatoxine devraient être maintenus aussi bas que possible. Néanmoins, d'autres publications ont utilisé un pouvoir tumoral de 1 ng/kg pc/jour pour le cancer du foie humain causé par l'exposition à l'AFB1 (équivalent à environ un cas de

cancer supplémentaire pour 10^5 personnes) comme DJA de référence. Étant donné que le PDI pour l'AFB1 est supérieure à 1 ng/kg pc/jour, on peut supposer que les apports quotidiens en AFB1 contribuent à des problèmes de santé importants dans la population tunisienne.

Pour calculer l'évaluation des risques des mycotoxines pour la santé, le PDI se divise par le DJA défini pour les mycotoxines. Le JECFA n'a pas défini les apports journaliers maximums tolérables (PMTDI) pour certaines mycotoxines, telles que les enniatines, qui ont été évaluées dans le cadre de cette étude. Les enniatines, fusaro-toxines émergentes, causent des effets nocifs sur les animaux (Dornetshuber et al., 2009; Föllmann, Behm, and Degen 2009; Tan et al., 2011; Wätjen et al., 2009). Il a été démontré que les céréales et les produits céréaliers sont les principales sources de consommation d'ENs (Bouafifssa et al., 2018; Juan et al., 2017; Zinedine et al., 2011). Ainsi, d'après les valeurs de PDI, on peut conclure que les échantillons de blé sont une source alimentaire importante d'enniatines pour les consommateurs tunisiens et cela peut causer des dégâts sur la santé.

En raison de l'exposition aux mycotoxines et de leur toxicité élevée pour l'Hommes et les animaux, diverses recherches ont été menées pour trouver des stratégies de détoxifications efficaces. Les approches biologiques pour éliminer les mycotoxines sont prometteuses. Dans la deuxième partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à étudier le pouvoir d'élimination *in vitro* des mycotoxines, soit détectés dans ce travail soit données par la bibliographie, trouvées dans le blé tunisien par l'utilisation de trois souches de bactéries lactiques (*Lactobacillus plantarum* MON03 (LP), *Lactobacillus paracasei* BEJ01 (LB) et *Lactobacillus rhamnosus* GAF06 (LR)) dans différentes conditions de culture. L'objectif de cette étude était de mieux comprendre le rôle de ces souches bactériennes dans l'adsorption, la dégradation ou l'élimination des mycotoxines.

En effet, ces souches ont été identifiées grâce au séquençage de l'ADNr 16S qui a montré une homologie de 99 % avec la souche standard de *Lactobacillus*.

Tout d'abord, nous avons testés le pouvoir d'élimination des mycotoxines (AFB1, AFM1, OTA et ZEN) par les deux LAB (LP et LB) en fonctions de différents facteurs (temps, état des cellules, pH, présence des cofacteurs et la concentration bactérienne). La détoxification de ces mycotoxines par les deux LAB a été testée sur une période allant de 0 à 24 heures. Les résultats ont montré que les taux de réduction maximale des mycotoxines atteignent leur maximum après 24 h d'incubation. Cela suggère que le pouvoir d'élimination augmente avec le temps d'incubation. Des travaux similaires effectués par Jebali et al. (2015), ont révélé que la LP (10^{10} UFC/ml) à l'état planctonique était capable d'éliminer l'AFB1 et l'AFM1 à partir

du PBS avec un pourcentage qui augmente avec le temps d'incubation. Aussi, de nombreuses études ont révélé que les LAB ont une capacité de liaison importante avec la ZEN, l'AFB1 et l'AFM1 dans le PBS (78 %, 82 % et 89 %, respectivement) après 24 heures d'incubation (Abbès et al., 2012a; Jebali et al., 2015). De plus, les deux souches de LAB avaient une plus grande capacité d'élimination des mycotoxines à une concentration comprise entre 10^{10} UFC/ml et 10^{11} UFC/ml. En effet, (Abbès et al., 2013; Jebali et al., 2018; Li et al., 2021) ont démontré que la concentration bactérienne est un facteur important dans la détoxification des mycotoxines par les LAB. De plus, El-Nezami et al. (2002), ont constaté que l'élimination de la ZEN du milieu liquide par *L. rhamnosus* GG et *L. rhamnosus* LC705 dépendait de la concentration de la bactérie dans le milieu d'incubation. Un minimum de 10^9 UFC/ml était nécessaire pour l'élimination significative de la toxine. Złoch et al. (2020), ont indiqué qu'une souche de *L. paracasei* isolée des produits laitiers pourrait neutraliser la ZEN par liaison et par biotransformation en une forme moins toxique. Selon Mokoena et al. (2005), les LAB réduisent les niveaux de la ZEN dans le maïs avec un pourcentage allant de 68 à 75 %.

Afin de mieux comprendre les raisons de la réduction des mycotoxines après incubation, des tests ont été réalisés sur des cellules bactériennes vivantes et d'autres mortes. En fait, les cellules non viables ont conservé le potentiel de réduire la quantité des mycotoxines avec un taux inférieur à celui des bactéries vivantes. Ces résultats suggèrent que la réduction des niveaux de toxines peut être due à l'absorption/dégradation plutôt qu'à l'adsorption. En revanche, une étude de Niderkorn et al. (2007) a montré que les LAB ont la capacité d'adsorber la ZEN, le DON et les FUM. De même, El-Nezami et al. (2004) ont découvert que les cellules vivantes de *Lactobacillus rhamnosus* GG ont une grande capacité d'adsorption de la ZEN, tout comme les cellules traitées par la chaleur ou l'acidité. De plus, une étude antérieure de Zhao et al. (2016) ont montré que la viabilité cellulaire n'est pas un facteur nécessaire à l'interaction entre les LAB et les FUM et que le site de liaison principal se trouve au niveau du peptidoglycane, un composant majeur de la paroi cellulaire bactérienne.

En outre, la destruction des bactéries par le HCL a montré une meilleure capacité à éliminer les mycotoxines par rapport aux cellules tuées par la chaleur. En fait, le chauffage conduit à la dénaturation des protéines ou à la formation de produits de réaction entre les polysaccharides, les peptides et les protéines. Tandis que, les conditions acides provoquent la rupture des liaisons glycosidiques des polysaccharides, libérant des monomères qui peuvent ensuite être fragmentés en aldéhydes. Ce résultat suggère que la membrane bactérienne joue un rôle important dans l'élimination des mycotoxines. Dans ce contexte, Hathout et al. (2011) ont

suggéré le mécanisme par lequel les LAB éliminent les mycotoxines. Ces auteurs ont constaté que les polysaccharides de la membrane cellulaire et les peptidoglycanes sont les deux principaux éléments impliqués dans l'élimination des toxines. Ils ont des activités médicinales et physiologiques importantes telles que les propriétés antioxydantes. Les enzymes protéolytiques des LAB jouent un rôle crucial dans la détoxification des mycotoxines dans les aliments (Abrunhosa et al., 2010; Juodeikiene et al., 2011).

En outre, les deux souches de LAB avaient une plus grande capacité à éliminer les mycotoxines à un pH neutre (6-7). Nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Tinyiro et al. (2011) qui ont constaté que le plus haut niveau d'élimination de la ZEN est de l'ordre de 75 % à pH 7, mais seulement 33 % à pH 3.

Pour suggérer d'éventuelles voies biochimiques par lesquelles les LAB peuvent réduire les mycotoxines, l'efficacité d'élimination a été étudiée en fonction de l'enrichissement du milieu en NaCl, $MgCl_2$ et $CaCl_2$. Les résultats ont montré clairement que le rendement est influencé par les ions métaboliques. L'ajout de MgCl2 a augmenté l'élimination de l'AFM1 et de l'AFB1 par la LP, tandis que l'enrichissement par le CaCl2 a amélioré l'élimination de la ZEN et de l'OTA par la LB. En fait, les ions Mg2+ sont essentiels à l'intégrité structurale des protéines et des acides nucléiques, ainsi qu'à la stabilité des membranes cellulaires et des ribosomes. Il agit comme un cofacteur avec l'ATP et active des enzymes. Le Ca^{2+} est également un cofacteur de la γ-carboxyglutamate décarboxylase. Lorsque les deux souches bactériennes ont été exposées au NaCl, leur capacité à éliminer ces mycotoxines a été réduite. L'ion Na+ est capable d'altérer le système à faible affinité pour la FB1, et d'inhiber ou de désactiver des enzymes membranaires.

Ensuite, nous avons testé le pouvoir d'élimination de l'ENB, la mycotoxine la plus abondante dans les échantillons de blé collectés en Tunisie, par les 3 LAB (LP, LB et LR) en fonction de différents facteurs (état des cellules et pH). La détoxification de ces mycotoxines par les trois LAB a été testée sur une période de 24 heures. Les trois bactéries ont été capables d'éliminer l'ENB quels que soient leur état et le pH du milieu. Les LAB non viables ont été capables d'éliminer plus d'ENB que les LAB viables. Nos résultats sont en accord avec ceux de Kankaanpää et al. (2000), qui ont étudié l'effet de deux souches probiotiques, *L. rhamnosus Lc* 705 et *L .rhamnosus* GG, sur l'AFB1. Selon leur hypothèse, les molécules d'AFs se lient à la paroi cellulaire des LAB.

Les LAB viables ont eu une capacité d'élimination beaucoup plus élevée à pH acide (3.5) qu'à pH basique (7.5). Dans d'autres travaux effectués par Zhao et al. (2016), le maximum

d'élimination de la FB1 et de la FB2 par *L. pentosus* X8 *et L. plantarum* B7 a été obtenu à pH 3. Ce processus diminue d'une façon proportionnelle à l'augmentation du pH. En revanche, les LAB non viables ont eu une capacité d'élimination élevée quelque soit le pH.

Dans le même contexte, selon Abbès et al. (2012a), le pourcentage le plus élevé d'élimination de la ZEN a été observé lorsque l'argile et les LAB ont été combinées en tant que composite avec la ZEN. Par conséquent, il est suggéré d'utiliser le mélange LP+ BT comme mesure préventive contre certaines mycotoxines. L'utilisation d'adsorbants dans les aliments destinés aux animaux est une nouvelle technologie pour protéger ces derniers contre la mycotoxicose. L'argile HSCAS et la montmorillonite se sont révélées efficaces pour protéger les animaux de laboratoire contre la toxicité de l'aflatoxine (Abbès et al., 2012; Abbès et al., 2007; Mayura et al., 1998). Selon Abbès et al. (2008), la montmorillonite a une forte affinité à l'AFB1 à différents niveaux de contamination. De nombreuses recherches ont révélé que la bentonite peut lier la ZEN *in vitro*, et cet adsorbant a été proposé comme une stratégie de détoxication du ZEN dans les aliments (Abbès et al., 2006; Bueno et al., 2005)**.** La bentonite, selon ses paramètres physicochimiques, a une grande capacité d'échange cationique et une grande surface d'absorption (Srinivasan and Fogler 1990).

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés à vérifier la non-toxicité des *Lactobacillus plantarum* MON03 et de la bentonite sur des lignées cellulaires et leur capacité à protéger les cellules Caco-2 contre la génotoxicité induite par l'AFB1 et la ZEN.

Tout d'abord, la cytotoxicité de la BT et de la LP a été évaluée par la détermination de leur CI_{50} sur diverses lignées cellulaires. L'étude *in vitro* a révélé que le test MTT a confirmé que la LP et la BT ne provoquent aucune toxicité, surtout sur la lignée cellulaire Caco-2. Ces données nous encouragent à utiliser les cellules Caco-2 dans le reste de l'étude *in vitro.* De plus, les cellules Caco-2 ont été choisies en raison de leur sensibilité élevée à l'AFB1 et à la ZEN, qui sont connues par leurs effets toxiques potentiels sur l'intestin (Belgacem et al., 2019; R. Jebali et al., 2015). De même, l'utilisation de l'argile et de *Lactobacillus* comme additifs alimentaires censés de lier les mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal nous a inspiré à choisir des cellules Caco-2. Dans des études antérieures, il est constaté que l'argile n'était pas toxique, même à des doses trés élevées de l'ordre de 20 g/kg de nourriture chez le rat (Wiles et al., 2004), de 10 g/kg chez la volaille (Chung et al., 1990) et de 5 g/kg chez la souris (Abbès et al., 2006).

La plupart des données publiées ont montré les avantages des adsorbants naturels pour réduire les effets génotoxiques de l'AFB1 et de la ZEN dans de nombreux modèles animales

(Abbès et al., 2006). Dans cette étude, les effets génotoxiques de la BT et de la LP sur les lignées cellulaires Caco-2 ont été déterminés. Le test de la fragmentation de l'ADN a montré que l'AFB1 et la ZEN n'ont pas attaqué l'ADN des cellules Caco-2 traitées par la BT et/ou la LP, ce qui pourrait être expliqué par la forte capacité de la BT et/ou de la LP à réduire la toxicité induite par l'AFB1 et la ZEN. Ces résultats étaient en harmonie avec ceux rapportés par Abbès et al. (2008), Belgacem et al. (2019) et Ben Salah-Abbès et al. (2020). Plusieurs scientifiques ont suggéré que l'interaction entre les mycotoxines et les métabolites produits par les souches LAB, comme les acides, les composés phénoliques, les acides gras et les peptides bioactifs de faible poids moléculaire, est responsable de la réduction des mycotoxines dans les aliments (Niderkorn et al., 2006). De plus, les adsorbants minéraux peuvent lier ou absorber les mycotoxines à leurs interstices, à leurs surfaces externes et à leurs bords en raison de leur volume interstitiel, de leur capacité de gonflement et de leur capacité d'échange cationique élevés (Deepthy and Balakrishnan 2005; Ito and Wagai 2017).

Dans cette étude, on a trouvé que la ZEN et l'AFB1 ont causé une génotoxicité dans les cellules Caco-2. En effet, une augmentation significative de l'activité de la caspase-3 dans les cellules traitées par l'AFB1 et la ZEN a été notée et elle a été trouvée diminuée en présence de la BT et/ou de la LP. Ceci peut être expliqué par un mécanisme proposé par Abdel-Wahhab et al. (2005) et Preetha et al. (2006) qui ont déclaré que la génération d'espèces réactifs d'oxygène intracellulaire (ROS) comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène (H2O2) au cours du traitement métabolique de l'AFB1 par le cytochrome P450 dans le foie exprime la toxicité induite par l'AFB1 et suggère que le stress oxydatif est effectivement un inducteur de l'apoptose (Chandra et al., 2000; Meki et al., 2004). De plus, des recherches antérieures ont montré que la ZEN provoque la génotoxicité et la cytotoxicité *in vivo* et *in vitro* (Kang et al., 2013), et elle a montré même la capacité d'induire une apoptose dans un certain nombre de lignées cellulaires (Hu et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Les résultats mentionnés précédemment ont montré que les LAB et/ou l'argile, du fait de leur capacité à éliminer les mycotoxines en fonction de plusieurs facteurs extrinsèques, sembles être efficaces pour une utilisation *in vivo*. En effet, par l'étude *in vivo* on a évalué les effets toxiques de l'AFB1, de la ZEN et de l'AFM1 chez des souris Balb /c et on a testé le potentiel détoxifiant des LAB (LP et LR) et/ou de l'argile (BT).

Dans un premier temps, nous avons étudier le pouvoir préventif de *L. rhamnosus* GAF06 (LR) et/ou la bentonite (BT) vis-à-vis de l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et l'immunotoxicité de l'AFM1 *in vivo*. L'AFM1, l'une des aflatoxines omniprésentes dans la chaîne alimentaire

tunisienne, a particulièrement retenu notre attention. C'est une toxine dérivée de la métabolisation de l'AFB1 et excrétée dans le lait. Elle est avérée l'un des facteurs étiologiques majeurs dans le développement du carcinome hépatocellulaire ainsi que dans la néphrotoxicité et l'immunotoxicité chez l'Homme et l'animal. Vu que la palette des dégâts engendrés par cette toxine est étendue, la mise au point de traitements industriels pour la décontamination des denrées alimentaires contaminées est devenue un des objectifs majeurs.

À la fin du traitement, aucune mortalité de souris traitées par l'AFM1 n'a été enregistrée mais les souris sont apparues cliniquement anormales. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par (Jebali et al., 2015) chez des souris males Balb/c exposées à l'AFM1 (0,27 mg/kg p.c.) durant 15 jours. Par ailleurs, le traitement par l'AFM1 a significativement diminué la consommation de la nourriture des souris d'où une perte de leur poids a été également enregistrée. De même, Abbès et al. (2013) ont montré que le poids corporel a significativement diminué chez les souris traitées à l'AFM1 (100 µg/kg p.c.) pendant 15 jours. Toutefois, les souris traitées par LR (2 mg/kg p.c. $\simeq 2\times10^8$ UFC/ml) seule ou en co-traitement avec l'AFM1, par la BT seule ou en co-traitement avec l'AFM1 et par le mélange LR-BT en co-traitement avec la toxine n'ont présenté aucun signe de toxicité générale. En effet, il y a une augmentation remarquable de la prise de poids dans ces groupes ce qui confirme que l'administration des LAB ou de l'argile confère un avantage pour la santé de l'hôte et que le mélange de ces deux derniers a beaucoup amélioré cet avantage. Ces résultats sont aussi en concordance avec ceux de (Abbès et al., 2007, 2006).

Par ailleurs, la modification des paramètres biochimiques par l'AFM1 est impliquée dans sa toxicité. Cette mycotoxine s'est montrée capable d'induire une diminution de la concentration sérique des protéines totales, d'albumine, d'acide urique ainsi que du cholestérol. Ces résultats sont conforment à ceux présentés par Hathout et al. (2011) qui ont montré une diminution des paramètres biochimiques chez des rats suite à une alimentation contaminée par les aflatoxines. De même, Kubena et al. (1995) ont signalé la réduction de la concentration du cholestérol chez la dinde exposée à la AFB1.

Les résultats actuels ont également révélé l'effet hépatoprotecteur et néphroprotecteur de la LR et de la BT et du mélange LR-BT contre les dommages induits par l'AFM1. En effet, la peroxydation lipidique peut être considérée comme un biomarqueur tardif de stress oxydatif et de dommages cellulaires (Łuczaj and Skrzydlewska 2003). Donc, l'augmentation du stress oxydatif dans le lot contaminé par l'AFM1 pourrait être le responsable des niveaux élevés de MDA dans les tissus hépatiques et rénaux. Ces résultats coïncident avec ceux menés par Costa

et al. (2007) qui ont montré la formation de peroxyde lipidique au cours du métabolisme de l'AFB1 dans les hépatocytes. En outre, l'organe dispose d'un mécanisme de défense efficace constitué d'un ensemble d'enzymes antioxydants endogènes tels que le SOD et la catalase. Ces enzymes constituent une ligne de défense qui se soutient mutuellement contre les ROS et les peroxydes lipidiques. En plus, le GSH est l'une des biomolécules importantes qui protègent les cellules contre la cytotoxicité induite chimiquement. Il participe à l'élimination des intermédiaires réactifs par conjugaison (Kovacs-Nolan et al., 2014). Par conséquent, l'augmentation significative de la peroxydation lipidique chez les lots traités par l'AFM1 pourrait être due à une importante réduction des activités des enzymes antioxydants ce qui est montré par notre étude. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Abdel-Wahhab & Aly (2005), Abdel-Wahhab et al. (2010), Choi et al. (2010) et El-Bahr (2015). Par conséquent, il ressort de ces données que l'AFB1 entraine une modification des paramètres biochimiques ainsi que le statut des enzymes antioxydants, ce qui reflète une dégénérescence du tissu hépatique et une perturbation du système biliaire ainsi qu'un trouble rénal. En revanche, la co-administration de l'AFM1 et de LR a corrigé ces effets toxiques. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Abbès et al. (2013), Gratz et al. (2007) et Salah-Abbès et al. (2015) qui ont montré l'effet protecteur de différents LAB contre la toxicité de l'AFM1. De plus, la co-administration de l'AFM1 et de la BT a pu réduire ces effets hépatotoxiques et néphrotoxiques. De même, plusieurs études ont montré l'efficacité de l'effet protecteur de l'argile considéré comme un adsorbant très efficace des aflatoxines dans le tractus gastro-intestinal des animaux, en diminuant leurs biodisponibilité et leurs effets toxiques (Phillips, 1999; M A Abdel-Wahhab et al., 2002). De même, d'autres études ont montré la capacité de l'argile à rétablir les paramètres hématologiques et biochimiques et à reduire la toxicité générale de la ZEN (Abbès et al., 2006). Par ailleurs l'administration du mélange LR-BT avec l'AFM1 a peut entrainer la normalisation des niveaux des enzymes antioxydants. Ces résultats coïncident avec ceux de Abbès et al. (2012) qui ont montré le pouvoir préventif du mélange BT-LP contre la toxicité de la ZEN.

Les résultats obtenus concernant les paramètres biologiques ont été confirmés et soutenus par les résultats histologiques des foies et des reins. En effet, L'examen microscopique des coupes histologiques du foie des souris traitées par l'AFM1 avec la coloration HE a montré plusieurs altérations par rapport au témoin. Par ailleurs, le traitement pendant 10 jours par la LP ou l'argile n'a pas modifié la structure histologique du foie qui a été comparable à celle des foies des souris témoins. Alors que, le traitement simultané par l'AFM1+LR, l'AFM1+BT et

AFM1+LR+BT a diminué significativement les effets toxiques de cette toxine. Les résultats ainsi obtenus sont en concordance avec ceux de Jebali et al. (2015**)** qui ont noté une toxicité hépatique chez des souris traitées par l'AFM1. En outre, ceci a été documenté dans des études pareilles. En effet, Abdel-wahhab et al. (2016) ont montré que l'AFB1 semble induire des effets délétères dans le tissu hépatique après un examen microscopique du foie. De même, des études récentes effectuées par El-Nekeety et al. (2017) et Vipin et al. (2017) ont révélé que l'AFB1 induit une vacuolisation des hépatocytes ainsi qu'une infiltration lymphocytaire comme montrée par nos résultats actuels.

Les résultats des coupes histologiques du rein nous a permis d'observer des changements tissulaires chez le groupe traité par l'AFM1 par rapport au groupe témoin. En fait, on a remarqué la présence des congestions, des infiltrations lymphocytaires, une hypertrophie glomérulaire, une dilatation des tubes contournés distaux et une accumulation des gouttelettes lipidiques. Les pathologies rénales observées ont été décrites par Jebali et al. (2015) qui a rapporté une néphrotoxicité chez des souris traitées par les aflatoxines. Des résultats similaires ont été donnés par Abdel-Wahhab et al. (2002)**.**

Le présent travail a montré qu'il y avait au niveau du foie et des reins des souris traitées par la AFM1+LR et AFM1+BT, des altérations histologiques moins importantes que celles sus-indiquées et induites par l'AFM1 seule. Ceci pourrait être expliqué par l'effet préventif de la LR et/ou la BT permettant la diminution de la biodisponibilité des toxines dans le tractus gastro-intestinal (Abbès et al., 2006, 2012).

Les résultats actuels ont également révélé que le traitement par l'AFM1, induit des effets immunotoxiques signalés par une augmentation de l'index splénique et une diminution de l'index thymique et de la viabilité des thymocytes et des splénocytes. En outre, il a été constaté que le nombre des différents phénotypes lymphocytaires était considérablement réduit après le traitement par l'AFM1, qui a induit encore des diminutions significatives de l'expression des lymphocytes T, CD3 +, CD4 +, CD8 + et CD56 +. Nos données ont montré que le traitement par l'AFM1 pendant 10 jours a eu un impact sur le nombre de globules blancs. Le nombre réduit de cellules CD56+ (natural killer NK) chez les souris traitées par l'AFM1 pourrait s'expliquer par le fait que les CD56+ sont la première ligne de défense du système immunitaire et ils sont responsables de l'élimination des substances nocives du corps. De plus, la diminution des concentrations d'IgA et d'IgG chez les animaux traités par l'AFM1 coïncide avec le développement d'une immunité humorale active, montrant que l'AFM1 a influencé à la fois les réponses immunitaires cellulaires et humorales.

Dans la présente étude, les souris co-traitées avec la LR et/ou la BT et l'AFM1 ont montré des améliorations significatives des altérations immunologiques. Ces résultats suggèrent que les LAB et la bentonite pourraient protéger contre les altérations immunologiques induites par l'AFM1. Ces résultats ont également été appuyés par (Carraro et al., 2014), qui ont utilisé la bentonite pour réduire le niveau d'AFM1 dans le lait de vaches. Le résultat a été expliqué par la capacité de la bentonite à adsorber les mycotoxines. La bentonite possède une grande surface d'absorption ayant des caractéristiques hydrophobes. En outre, il a été suggéré que les aflatoxines se lient aux cellules bactériennes via des interactions non-covalentes (Bovo et al., 2013). Bien que le mécanisme de liaison de ces souches n'était pas bien compris, certains scientifiques ont suggéré que les principaux sites de liaison sont les polysaccharides et les peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne (Abdelmotilib et al., 2018). La souche *Lactobacillus rhamnosus* s'est avérée l'une des souches les plus efficaces pour la réduction des aflatoxines. Ceci peut être attribué à la production d'exo-polysaccharides et à la présence de peptidoglycanes (Lahtinen et al., 2004; Landersjö et al., 2002).

Dans un second temps, nous avons étudié le pouvoir préventif de *L. plantarum* MON03 (LP) et/ou de la bentonite vis-à-vis de la reprotoxicité de la ZEN et del'AFB1. Pendant la période de traitement, il y à la mort d'une souris co-traitée par l'AFB1 et la ZEN et les autres souris sont apparues cliniquement anormales. Chez ces dernières on a noté des troubles de comportements et de mouvements et une perte d'appétit très remarquable. Alors que les souris co-traitées par les deux mycotoxines et le mélange (LP+BT) n'ont pas montré aucun signe de toxicité. La ZEN et l'AFB1 peuvent s'accumuler dans les testicules, perturbant ainsi la spermatogénèse et les performances de la reproduction. Nos résultats ont indiqué que les paramètres de la spermatogenèse étudiés ont été affectés. En fait, la concentration en spermatozoïdes a été significativement touchée. Ces paramètres sont liés aux tubes séminifères, siège de la spermatogenèse et de la maturation des cellules germinales. En revanche chez le groupe co-traité par les mycotoxines avec le mélange LP+BT on a noté une réduction des effets négatifs sur le système de reproduction. Le mécanisme d'action possible des deux mycotoxines dans la médiation de la spermatogenèse peut être dû à leur potentiel à générer des ERO et à induire l'apoptose (entrainant la mort des cellules germinales). Cela entraine une diminution du nombre de cellules germinales, ce qui entraine une diminution du nombre des spzs dans les testicules et l'épididyme. En effet, des études suggèrent que l'exposition à la ZEN peut altérer la fonction reproductrice et perturber la genèse des spermatozoïdes et d'ovocytes chez l'Homme et les animaux (Adibnia, Razi, and Malekinejad 2016; Yousef et al., 2017). Long et al. (2017)

et Pang et al. (2017) ont découvert que le traitement des souris mâles par la ZEN pendant 7 jours consécutifs entraine une diminution du poids des testicules et des épididymes. De plus, la ZEN entraine une diminution du nombre des spz et des connexions intercellulaires. Elle provoque aussi une augmentation des cassures des brins d'ADN et une diminution des cellules germinales (Pang et al., 2017). Les effets de la ZEN chez les animaux de laboratoire ainsi que chez l'Homme, illustrent son activité œstrogénique (Frizzell et al., 2015; Tatay et al., 2018; Vejdovszky et al., 2017). Elle cause des perturbations du cycle sexuel, des modifications morphologiques et physiologiques des gonades entrainant ainsi une diminution de la fertilité (Long et al., 2016; Pang et al., 2017; Yang et al., 2016). En plus l'exposition aux AFs génère des espèces réactives d'oxygène (ERO) intracellulaires telles que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène au cours du métabolisme de l'AFB1 (Abdel-Wahhab et al., 2005; Preetha et al., 2006), provoquant un stress oxydatif qui est un facteur clé dans l'induction de l'apoptose (Abdel-Wahhab and Aly, 2003, 2005; Choi et al., 2010; Kanbur et al., 2011 ; Meki et al., 2004).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail s'inscrit dans la problématique de la sécurité sanitaire et dans le cadre de la décontamination des denrées alimentaires contaminées par les mycotoxines par une stratégie intégrée et durable. En effet, nous avons évaluer d'une part la prévalence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie et d'autre part le pouvoir préventif des bactéries lactiques et de l'argile contre leurs effets toxiques in *vitro* et in *vivo*.

Tout d'abord, nous avons étudié l'occurrence de 22 mycotoxines dans la filière blé dur en Tunisie afin de confirmer la contamination et d'évaluer son risque pour la population. Par la suite, nous avons essayé de réduire les niveaux de ces mycotoxines *in vitro* et de prévenir leurs effets toxiques i*n vivo* par l'utilisation des bactéries lactiques et de l'argile de type Bentonite.

L'étude de l'occurrence des mycotoxines dans la filière blé dur en Tunisie a montré que les enniatines sont les principales mycotoxines trouvées dans les échantillons de blé. Elles ont été détectées à tous les points de collecte du blé (au champ, à la récolte, au pré-stockage et au stockage), et dans les deux régions d'échantillonnage (continentale et littorale) en 2020. Dans tous les échantillons de blé collectés à la récolte dans la région littorale en 2021 et dans un seul échantillon de blé stocké récolté également dans la même région, les enniatines ont été également détectées. L'AFB1 n'a été détectée que dans la région continentale en 2020 à trois points de collecte (au champ, au pré-stockage et au stockage) et elle a été plus fréquemment et abondamment trouvée dans le blé stocké avec une fréquence de 60% et dans le blé pré-stocké avec une fréquence de 40%. L'ENB était la mycotoxine la plus fréquente et abondante dans les deux années d'échantillonnage. Six sur 46 échantillons collectés en 2020 ont été positifs pour l'AFB1, et tous les échantillons dépassaient la limite européenne de 2 µg/kg. Afin d'évaluer le risque des mycotoxines pour la population tunisienne, nos résultats montrent bien que les adultes consommaient quotidiennement 35,8 ng/kg pc/jour d'AFB1 provenant du blé. On peut conclure que les niveaux d'AFB1 présents dans le blé présentent un risque important pour la santé des consommateurs tunisiens.

Les résultats de l'étude *in vitro*, ont révélé que les souches LP, LB et LR ont une capacité importante à absorber les mycotoxines et que ces interactions n'ont une activité optimale que dans certaines conditions. En outre, l'AFB1 et la ZEN sont génotoxiques pour les cellules Caco-2. En conséquence, ces toxines peuvent causer une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN et de l'activité de la caspase-3. Les bio-produits utilisées (BT et LP) se sont avérés efficaces pour prévenir les effets génotoxiques sur les cellules Caco-2. Ils peuvent réguler les expressions de la caspase-3 et induire une diminution significative de la

fragmentation de l'ADN. L'administration du mélange BT+LP avec la ZEN et l'AFB1 a pu atténué leur effet négatif des deux toxines d'une manière plus significative que lorsque les deux produits sont administrés séparément. Ainsi, le composite BT+LP peut être utilisé comme une stratégie d'élimination de l'AFB1 et de la ZEN dans les processus alimentaires.

Ensuite, nous avons évaluer le pouvoir de détoxification de la LR et/ou la BT vis-à-vis de l'AFM1 *in vivo*. Après une administration quotidienne de l'AFM1 seule et co-traitée avec LR et/ou BT à des souris pendant 10 jours, nos résultats ont démontré que cette mycotoxine a induit une perte de l'appétit engendrant une diminution du poids corporel et des modifications significatives des paramètres biochimiques et d'enzymes antioxydants. L'ajout de la LR et/ou de la BT, séparées ou en combinaison, à l'AFM1 a montré qu'elles ont été capables de prévenir les altérations biochimiques provoqués par la mycotoxine.

Étant donné que le foie et les reins sont les organes cibles des mycotoxines, le pouvoir détoxifiant du mélange LR+BT contre l'AFB1 a été évalué au niveau de ces organes. L'AFM1 seule a causé des altérations histologiques graves et combinée avec la LP et/ou la BT n'a pas montré d'effet toxique. De même, la prévention de la toxicité à ce niveau a été aussi plus significative avec le mélange de bactérie et d'argile montrant un effet additif des pouvoir de détoxification des deux produits utilisés. Les traitements par LR seule ou l'argile seule n'ont signalé aucun signe de toxicité.

D'autre part, nous avons évalué le pouvoir de détoxification de l'AFB1et de la ZEN *in vivo* par l'utilisation de la LP et/ou la BT. Nous avons étudié la toxicité générale, chez des souris Balb/c, après une administration quotidienne des deux mycotoxines pendant 20 jours. Des troubles de comportement et de mouvement et une perte d'appétit remarquable ont été signalés. Par contre, l'administration de l'AFB1+ZEN combinées avec la LP et/ou la BT a montré une amélioration de l'état nutritionnel chez les souris traitées. De même, nous avons étudié l'effet de ces deux mycotoxines en tant que perturbateurs endocriniens. Nos résultats ont montré une reprotoxicité chez les souris mâles marquée par une perturbation de la spermatogenèse. L'administration de la LP et/ou de la BT en combinaison avec l'AFB1 et la ZEN a pu prévenir les effets néfastes de ces deux mycotoxines sur la fertilité des souris males traitées.

Ces résultats constitueront un ensemble de données qui servira à l'évaluation de risque des mycotoxines sur la population tunisienne suite à la consommation de blé contaminé. Ces données permettront encore de valoriser l'utilisation des LAB et de l'argile de type bentonite dans la prévention contre la toxicité des mycotoxines et donc dans la protection du consommateur. Ceci nous incite à approfondir notre étude par l'augmentation du nombre des

échantillons de blé et par l'analyse de la prévalence des multi mycotoxines dans d'autres céréales. En parallèle, nous devons étudier les mécanismes d'action impliqués dans le pouvoir préventif des LAB et/ou d'argile vis-à-vis de ces contaminants. De même, nous sommes appelés à investiguer d'autres produits à rôle protecteur telles que les substances biologiques d'origine végétale qui ont été toujours considérées une mine d'agents thérapeutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbès, Samir, Zouhour Ouanes, Jalila Ben Salah-Abbès, Mosaad A. Abdel-Wahhab, Ridha Oueslati, and Hassen Bacha. 2007. "Preventive Role of Aluminosilicate Clay against Induction of Micronuclei and Chromosome Aberrations in Bone-Marrow Cells of Balb/c Mice Treated with Zearalenone." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 631(2):85–92. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.01.012.

Abbès, Samir, Zouhour Ouanes, Jalila ben Salah-Abbès, Zohra Houas, Ridha Oueslati, Hassen Bacha, and Omar Othman. 2006. "The Protective Effect of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate against Haematological, Biochemical and Pathological Changes Induced by Zearalenone in Mice." *Toxicon* 47(5):567–74. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.016.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Yousra Bouraoui, Sarra Oueslati, and Ridha Oueslati. 2012. "Natural Occurrence of Aflatoxins (B1 and M1) in Feed, Plasma and Raw Milk of Lactating Dairy Cows in Beja, Tunisia, Using ELISA." *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 5(1):11–15. doi: 10.1080/19393210.2011.640756.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Mouna M. Hetta, Mohamed Ibrahim, Mosaad A. Abdel-Wahhab, Hassen Bacha, and Ridha Oueslati. 2008. "Efficacy of Tunisian Montmorillonite for in Vitro Aflatoxin Binding and in Vivo Amelioration of Physiological Alterations." *Applied Clay Science* 42(1–2):151–57. doi: 10.1016/j.clay.2008.01.004.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-abbès, Kais Nahdi, Ridha Ben, Mona M. Hetta, Ahmed A. El-kady, Mosaad A. Abdel-wahhab, and Ridha Oueslati. 2007. "Inactivation of Cadmium Induced Immunotoxicological Alterations in Rats by Tunisian Montmorillonite Clay." 7:750–60. doi: 10.1016/j.intimp.2007.01.013.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-abbès, Zouhour Ouanes, and Zohra Houas. 2006. "Preventive Role of Phyllosilicate Clay on the Immunological and Biochemical Toxicity of Zearalenone in Balb / c Mice." 6:1251–58. doi: 10.1016/j.intimp.2006.03.012.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Zouhour Ouanes, Zohra Houas, Omar Othman, Hassen Bacha, Mosaad A. Abdel-Wahhab, and Ridha Oueslati. 2006. "Preventive Role of Phyllosilicate Clay on the Immunological and Biochemical Toxicity of Zearalenone in Balb/c Mice." *International Immunopharmacology* 6(8):1251–58.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Hakimeh Sharafi, Rania Jebali, Kambiz Akbari Noghabi, and Ridha Oueslati. 2013. "Ability of Lactobacillus Rhamnosus GAF01 to Remove AFM1 in Vitro and to Counteract AFM1 Immunotoxicity in Vivo." *Journal of Immunotoxicology* 10:279–86. doi: 10.3109/1547691X.2012.718810.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Hakimeh Sharafi, Kambiz Akbari Noghabi, and Ridha Oueslati. 2012a. "Interaction of Lactobacillus Plantarum MON03 with Tunisian Montmorillonite Clay and Ability of the Composite to Immobilize Zearalenone in Vitro and Counteract Immunotoxicity in Vivo." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 34:944–50. doi: 10.3109/08923973.2012.674139.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Hakimeh Sharafi, Kambiz Akbari Noghabi, and Ridha Oueslati. 2012b. "Interaction of Lactobacillus Plantarum MON03 with Tunisian Montmorillonite Clay and Ability of the Composite to Immobilize Zearalenone in Vitro and Counteract Immunotoxicity in Vivo." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 34:944–50. doi: 10.3109/08923973.2012.674139.

Abbès, Samir, Jalila Ben Salah-Abbès, Hakimeh Sharafi, Ridha Oueslati, and Kambiz Akbari Noghabi. 2013. "Lactobacillus Paracasei BEJ01 Prevents Immunotoxic Effects during Chronic Zearalenone Exposure in Balb/c Mice." *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 35(3):341–48. doi: 10.3109/08923973.2013.772194.

Abdallah, Mohamed F., Gözde Girgin, and Terken Baydar. 2019. "Mycotoxin Detection in Maize, Commercial Feed, and Raw Dairy Milk Samples from Assiut City, Egypt." *Veterinary Sciences* 6(2):57. doi: 10.3390/VETSCI6020057.

Abdel-Kareem, M. Marwa, A. M. Rasmey, and A. A. Zohri. 2019. "The Action Mechanism and Biocontrol Potentiality of Novel Isolates of Saccharomyces Cerevisiae against the Aflatoxigenic Aspergillus Flavus." *Letters in Applied Microbiology* 68:104–11. doi: 10.1111/lam.13105.

Abdel-Wahhab, M. A., and A. M. Kholif. 2008. "Mycotoxins in Animal Feeds and Prevention Strategies: A Review." *Asian Journal of Animal Sciences* 2(1):7–25.

Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, and H. A. Amra. 1999. "Effect of Aluminosilicates and Bentonite on Aflatoxin-Induced Developmental Toxicity in Rat." *Journal of Applied Toxicology* 19(3):199–204. doi: 10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<199::AID-JAT558>3.0.CO;2-D.

Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, I. M. Farag, N. F. Abbas, and H. A. Amra. 1998. "Potential Protective Effect of HSCAS and Bentonite against Dietary Aflatoxicosis in Rat: With Special Reference to Chromosomal Aberrations." *Natural Toxins* 6(5):211–18. doi: 10.1002/(SICI)1522-7189(199809/10)6:5<211::AID-NT31>3.0.CO;2-8.

Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, and F. A. Khalil. 2002. "Physiological and Toxicological Responses in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet with or without Sorbent Materials." *Animal Feed Science and Technology* 97(3–4):209–19. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00342-X.

Abdel-Wahhab, M A, S. A. Nada, and F. A. Khalil. 2002. "Physiological and Toxicological Responses in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet with or without Sorbent Materials." *Animal Feed Science and Technology* 97(3–4):209–19.

Abdel-Wahhab, Mosaad A., and Soher E. Aly. 2003. "Antioxidants and Radical Scavenging Properties of Vegetable Extracts in Rats Fed Aflatoxin-Contaminated Diet." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(8):2409–14.

Abdel-Wahhab, Mosaad A., Ahmed A. El-Kady, Aziza M. Hassan, Omaima M. Abd El-Moneim, and Sekena H. Abdel-Aziem. 2015. "Effectiveness of Activated Carbon and Egyptian Montmorillonite in the Protection against Deoxynivalenol-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Rats." *Food and Chemical Toxicology* 83:174–82. doi: 10.1016/j.fct.2015.06.015.

Abdel-Wahhab, Mosaad A., Aziza M. Hasan, Soher E. Aly, and Karima F. Mahrous. 2005. "Adsorption of Sterigmatocystin by Montmorillonite and Inhibition of Its Genotoxicity in the Nile Tilapia Fish (Oreachromis Nilaticus)." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 582:20–27. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.12.009.

Abdel-Wahhab, Mosaad A., Nabila S. Hassan, Ahmed A. El-Kady, Yasser A. Khadrawy, Aziza A. El-Nekeety, Sherif R. Mohamed, Hafiza A. Sharaf, and Fathia A. Mannaa. 2010. "Red Ginseng Extract Protects against Aflatoxin B1 and Fumonisins-Induced Hepatic Pre-Cancerous Lesions in Rats." *Food and Chemical Toxicology* 48(2):733–42.

Abdel-Wahhab, Mosaad A, Ataa Said, and Antje Huefner. 2005. "NMR and Radical Scavenging Activities of Patuletin from Urtica Urens. Against Aflatoxin B1." *Pharmaceutical Biology* 43(6):515–25.

Abdel-wahhab, Mosaad A., Asmaa S. Salman, Mohamed I. M. Ibrahim, Ahmed A. El-kady, Sekena H. Abdel-aziem, Nabila S. Hassan, and Ahmed I. Waly. 2016. "Curcumin Nanoparticles Loaded Hydrogels Protects against a Fl Atoxin B 1 -Induced Genotoxicity in Rat Liver." *Food and Chemical Toxicology* 94:159–71. doi: 10.1016/j.fct.2016.06.005.

Abdel-wahhab, Prof Mosaad Attia. 2016. "Antioxidant and Hepatorenoprotective Effects of

Thyme Vulgaris Extract in Rats during Aflatoxicosis." (January).
Abdel-Wahhab, M. A., and S. E. Aly. 2005. "Antioxidant Property of Nigella Sativa (Black Cumin) and Syzygium Aromaticum (Clove) in Rats during Aflatoxicosis." *Journal of Applied Toxicology: An International Journal* 25(3):218–23.
Abdel-Wahhab, Mosaad A., Hanaa Ahmed H, and Mohamad M. Hagazi. 2006. "Prevention of Aflatoxin B1-initiated Hepatotoxicity in Rat by Marine Algae Extracts." *Journal of Applied Toxicology: An International Journal* 26(3):229–38.
Abdelmotilib, Neveen, Gamal Hamad, Hesham Elderea, Eglal Salem, and Sobhy Sohaimy. 2018. "Aflatoxin M1 Reduction in Milk by a Novel Combination of Probiotic Bacterial and Yeast Strains." *European Journal of Nutrition & Food Safety* 8(2):83–99. doi: 10.9734/ejnfs/2018/39486.
Abid-Essefi, S., Z. Ouanes, W. Hassen, I. Baudrimont, E. Creppy, and H. Bacha. 2004. "Cytotoxicity, Inhibition of DNA and Protein Syntheses and Oxidative Damage in Cultured Cells Exposed to Zearalenone." *Toxicology in Vitro* 18(4):467–74. doi: 10.1016/j.tiv.2003.12.011.
Abid-Essefi, Salwa, Isabelle Baudrimont, Wafa Hassen, Zouhour Ouanes, Théophile A. Mobio, Rachid Anane, Edmond E. Creppy, and Hassen Bacha. 2003. "DNA Fragmentation, Apoptosis and Cell Cycle Arrest Induced by Zearalenone in Cultured DOK, Vero and Caco-2 Cells: Prevention by Vitamin E." *Toxicology* 192(2–3):237–48. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00329-9.
Abid, Salwa, Wafa Hassen, Abdellatif Achour, Habib Skhiri, Khira Maaroufi, Farielle Ellouz, Edmond Creppy, and Hassen Bacha. 2003. "Ochratoxin A and Human Chronic Nephropathy in Tunisia: Is the Situation Endemic?" *Human and Experimental Toxicology* 22(2):77–84. doi: 10.1191/0960327103ht328oa.
Abouloifa, Houssam, Sara Gaamouche, Yahya Rokni, Ismail Hasnaoui, Reda Bellaouchi, Nabil Ghabbour, Salwa Karboune, Milena Brasca, Guy D'Hallewin, Riadh Ben Salah, Ennouamane Saalaoui, and Abdeslam Asehraou. 2021. "Antifungal Activity of Probiotic Lactobacillus Strains Isolated from Natural Fermented Green Olives and Their Application as Food Bio-Preservative." *Biological Control* 12(2):683–96. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104450.
Abrunhosa, Luís, Robert R. M. Paterson, and Armando Venâncio. 2010. "Biodegradation of Ochratoxin a for Food and Feed Decontamination." *Toxins* 1078–99.
Adams, M. R., and P. Marteau. 1995. "On the Safety of Lactic Acid Bacteria from Food." *International Journal of Food Microbiology* 27(2–3):263.
Adibnia, Elmira, Mazdak Razi, and Hassan Malekinejad. 2016. "Zearalenone and 17 β-Estradiol Induced Damages in Male Rats Reproduction Potential; Evidence for ERα and ERβ Receptors Expression and Steroidogenesis." *Toxicon* 15(120):133–46. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.08.009.
Aebi, Hugo. 1984. "[13] Catalase in Vitro." Pp. 121–26 in *Methods in enzymology*. Vol. 105. Elsevier.
AFSSA. 2009. *Évaluation Des Risques Liés à La Présence de Mycotoxines Dans Les Chaînes Alimentaires Humaine et Animale.*
AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire. n.d. "Des Aliments, 2006." *Evaluation Des Risques Liés à La Présence de Mycotoxines Dans Les Chaînes Alimentaires Humaine et Animale, Rapport Synthétique, 82p.*
Ahlberg, Sara, Delia Grace, Gideon Kiarie, Yumi Kirino, and Johanna Lindahl. 2018. "And Mid-Income Dairy Consumers in Kenya." 1–15. doi: 10.3390/toxins10090348.
Al-Anati, L., and E. Petzinger. 2006. "Immunotoxic Activity of Ochratoxin A." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29(2):79–90. doi: 10.1111/j.1365-2885.2006.00718.x.

Alassane-Kpembi, Imourana, Gerd Schatzmayr, Ionelia Taranu, Daniela Marin, Olivier Puel, and Isabelle Paule Oswald. 2017. "Mycotoxins Co-Contamination: Methodological Aspects and Biological Relevance of Combined Toxicity Studies." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 67(16):3489–3507. doi: 10.1080/10408398.2016.1140632.

Allègre, J. 2012. "Les Silicates d'alumine (Argiles) En Thérapeutique, Une Pratique Coutumière Ancienne Relayée Dans La Médecine Moderne." *Mémoire de Thèse, Faculté de Médecine de Bobigny, Léonard de Vinci, Université Paris XIII*.

Alshannaq, Ahmad, and Jae Hyuk Yu. 2017. "Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 632.

Aly, Salwa Ahmed. 2019. "Fate of Aflatoxin M 1 during Manufacture and Storage of Yoghurt." (February):4–6.

Ben Amara, Aya, Amel Mehrez, Chayma Ragoubi, Roberto Romero-González, Antonia Garrido Frenich, Ahmed Landoulsi, and Imed Maatouk. 2022. "Fungal Mycotoxins Reduction by Gamma Irradiation in Naturally Contaminated Sorghum." *Journal of Food Processing and Preservation* 46(3). doi: 10.1111/jfpp.16345.

Andrade, Patrícia Diniz, Rebecca Rodrigues Dantas, Tatiana Loureiro da Silva de Moura-Alves, and Eloisa Dutra Caldas. 2017. "Determination of Multi-Mycotoxins in Cereals and of Total Fumonisins in Maize Products Using Isotope Labeled Internal Standard and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Positive Ionization." *Journal of Chromatography A* 1490:138–47. doi: 10.1016/j.chroma.2017.02.027.

Anon. 2009. "L 118/66." (386):2009.

Armando, M. R., C. A. Dogi, C. A. R. Rosa, A. M. Dalcero, and L. R. Cavaglieri. 2012. "Saccharomyces Cerevisiae Strains and the Reduction of Aspergillus Parasiticus Growth and Aflatoxin B1 Production at Different Interacting Environmental Conditions, in Vitro." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 29(9):1443–49. doi: 10.1080/19440049.2012.698655.

Avantaggiato, Giuseppina, Robert Havenaar, and Angelo Visconti. 2003. "Assessing the Zearalenone-Binding Activity of Adsorbent Materials during Passage through a Dynamic in Vitro Gastrointestinal Model." *Food and Chemical Toxicology* 41(10):1283–90. doi: 10.1016/S0278-6915(03)00113-3.

Awuchi, Chinaza Godswill, Erick Nyakundi Ondari, Chukwuka U. Ogbonna, Anjani K. Upadhyay, Katarzyna Baran, Charles Odilichukwu R. Okpala, Malgorzata Korzeniowska, and Raquel P. F. Guiné. 2021. "Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention and Detoxification Strategies-a Revisit." *Foods* 1259.

Ayed, Sourour, Saida Mlouhi, and Imen Bouhaouel. 2021. "Adoption of Durum Wheat Cultivar 'Salim' with a Technical Package and Its Resilience to Climate Change Impacts in Smallholders: Case of Nebeur/Kef Region, Tunisia." *Plants* 10:2379. doi: 10.3390/plants10112379.

Aziz, Q., J. Doré, A. Emmanuel, F. Guarner, and E. M. M. Quigley. 2013. "Gut Microbiota and Gastrointestinal Health: Current Concepts and Future Directions." *Neurogastroenterology & Motility* 25(1):4–15.

Babalola, Busayo Joshua, Jing Li, Claire Elizabeth Willing, Yong Zheng, Yong Long Wang, Hui Yun Gan, Xing Chun Li, Cong Wang, Catharine A. Adams, Cheng Gao, and Liang Dong Guo. 2022. "Nitrogen Fertilisation Disrupts the Temporal Dynamics of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Hyphae but Not Spore Density and Community Composition in a Wheat Field." *New Phytologist* 134(6):2057–72. doi: 10.1111/nph.18043.

Barbiroli, A., F. Bonomi, S. Benedetti, S. Mannino, L. Monti, T. Cattaneo, and S. Iametti. 2007. "Binding of Aflatoxin M1 to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine

Milk." *Journal of Dairy Science* 90(2):532–40.
Bavaro, Simona L., Antonia Susca, Jens C. Frisvad, Maria Tufariello, Agathi Chytiri, Giancarlo Perrone, Giovanni Mita, Antonio F. Logrieco, and Gianluca Bleve. 2017. "Isolation, Characterization, and Selection of Molds Associated to Fermented Black Table Olives." *Frontiers in Microbiology* 8(JUL). doi: 10.3389/fmicb.2017.01356.
Beganović, Jasna, Jadranka Frece, Blaženka Kos, Andreja Leboš Pavunc, Ksenija Habjanič, and Jagoda Šušković. 2011. "Functionality of the S-Layer Protein from the Probiotic Strain Lactobacillus Helveticus M92." *Antonie Van Leeuwenhoek* 100(1):43–53.
Bejaoul, H., F. Mathieu, P. Taillandier, and A. Lebrihi. 2004. "Ochratoxin A Removal in Synthetic and Natural Grape Juices by Selected Oenological Saccharomyces Strains." *Journal of Applied Microbiology* 97(5):1038–44. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x.
Belgacem, Hela, Jalila Ben Salah-Abbès, Khawla Ezzdini, Mosaad A. Abdel-Wahhab, Abdellah Zinedine, and Samir Abbès. 2019. "Lactobacillus Plantarum MON03 Counteracts Zearalenone Génotoxicty in Mice: Chromosome Aberrations, Micronuclei, DNA Fragmentation and Apoptotique Gene Expression." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 840:11–19. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.12.008.
Belkacem-Hanfi, Nesrine, Imene Fhoula, Nabil Semmar, Amel Guesmi, Isabelle Perraud-Gaime, Hadda Imen Ouzari, Abdellatif Boudabous, and Sevastianos Roussos. 2014. "Lactic Acid Bacteria against Post-Harvest Moulds and Ochratoxin A Isolated from Stored Wheat." *Biological Control* 76:52–59. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.05.001.
Bellí, N., S. Marín, V. Sanchis, and A. J. Ramos. 2004. "Influence of Water Activity and Temperature on Growth of Isolates of Aspergillus Section Nigri Obtained from Grapes." *International Journal of Food Microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.004.
Bennett, J. W., and M. Klich. 2013. "Micotoxinas." *Clinical Microbiology Reviews* 18(6):1607–6079. doi: 10.1128/CMR.16.3.497.
Bensassi, Fatma, Chiraz Zaied, Salwa Abid, Mohamed Rabeh Hajlaoui, and Hassan Bacha. 2010. "Occurrence of Deoxynivalenol in Durum Wheat in Tunisia." *Food Control* 21(3):281–85. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.06.005.
Bhatnagar-Mathur, Pooja, Sowmini Sunkara, Madhurima Bhatnagar-Panwar, Farid Waliyar, and Kiran Kumar Sharma. 2015. "Biotechnological Advances for Combating Aspergillus Flavus and Aflatoxin Contamination in Crops." *Plant Science* 234:119–32.
Binder, E. M., L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl, and J. Richard. 2007. "Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Commodities, Feeds and Feed Ingredients." *Animal Feed Science and Technology* 137(3–4):265–82. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.005.
Björkstén, Bengt. 2004. "Effects of Intestinal Microflora and the Environment on the Development of Asthma and Allergy." *Springer Seminars in Immunopathology* 257–70.
Blesa, Jesus, Juan Carlos Moltó, Samira El Akhdari, Jordi Mañes, and Abdellah Zinedine. 2014. "Simultaneous Determination of Fusarium Mycotoxins in Wheat Grain from Morocco by Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry." *Food Control* 64:1.5. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.04.019.
Bohórquez, D. V, N. E. Bohórquez, and P. R. Ferket. 2011. "Ultrastructural Development of the Small Intestinal Mucosa in the Embryo and Turkey Poult: A Light and Electron Microscopy Study." *Poultry Science* 90(4):842–55.
Bondy, Genevieve S., and James J. Pestka. 2000. "Immunomodulation by Fungal Toxins." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* 3(2):109–43. doi: 10.1080/109374000281113.
Bouafifssa, Youssef, Lara Manyes, Mohamed Rahouti, Jordi Mañes, Houda Berrada, Abdellah Zinedine, and Mónica Fernández-Franzón. 2018. "Multi-Occurrence of Twenty

Mycotoxinsin Pasta and a Risk Assessment in the Moroccan Population." *Toxins* 10(11):432. doi: 10.3390/toxins10110432.

Bouaziz, Chayma, Ossama Sharaf el dein, Emna El Golli, Salwa Abid-Essefi, Catherine Brenner, Christophe Lemaire, and Hassen Bacha. 2008. "Different Apoptotic Pathways Induced by Zearalenone, T-2 Toxin and Ochratoxin A in Human Hepatoma Cells." *Toxicology* 254:19–28. doi: 10.1016/j.tox.2008.08.020.

Bovo, Fernanda, Carlos H. Corassin, Roice E. Rosim, and Carlos A. F. de Oliveira. 2013. "Efficiency of Lactic Acid Bacteria Strains for Decontamination of Aflatoxin M1 in Phosphate Buffer Saline Solution and in Skimmed Milk." *Food and Bioprocess Technology* 6(8):2230–34. doi: 10.1007/s11947-011-0770-9.

Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2):248–54.

Bryden, Wayne L. 2012. "Mycotoxin Contamination of the Feed Supply Chain: Implications for Animal Productivity and Feed Security." *Animal Feed Science and Technology* 173(1–2):134–58.

Bueno, Dante J., Liliana Di Marco, Guillermo Oliver, and Alicia Bardón. 2005. "In Vitro Binding of Zearalenone to Different Adsorbents." *Journal of Food Protection* 68(3):613–15. doi: 10.4315/0362-028X-68.3.613.

Buffie, Charlie G., and Eric G. Pamer. 2013. "Microbiota-Mediated Colonization Resistance against Intestinal Pathogens." *Nature Reviews Immunology* 13(11):790–801.

Burlakoti, Rishi R., Shaukat Ali, Gary A. Secor, Stephen M. Neate, Marcia P. McMullen, and Tika B. Adhikari. 2008. "Comparative Mycotoxin Profiles of Gibberella Zeae Populations from Barley, Wheat, Potatoes, and Sugar Beets." *Applied and Environmental Microbiology* 74(21):6513–20. doi: 10.1128/AEM.01580-08.

BURTON, K. 1956. "A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid." *The Biochemical Journal* 62(2):315. doi: 10.1042/bj0620315.

Cabo, M. L., A. F. Braber, and P. M. F. J. Koenraad. 2002. "Apparent Antifungal Activity of Several Lactic Acid Bacteria against Penicillium Discolor Is Due to Acetic Acid in the Medium." 65(8):1309–16.

Calado, Thalita, María Luisa Fernández-Cruz, Sandra Cabo Verde, Armando Venâncio, and Luís Abrunhosa. 2018. "Gamma Irradiation Effects on Ochratoxin A: Degradation, Cytotoxicity and Application in Food." *Food Chemistry* 240:463–71. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.136.

Calado, Thalita, Armando Venâncio, and Luís Abrunhosa. 2014. "Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(5):1049–61. doi: 10.1111/1541-4337.12095.

Carraro, A., A. De Giacomo, M. L. Giannossi, L. Medici, M. Muscarella, L. Palazzo, V. Quaranta, V. Summa, and F. Tateo. 2014. "Clay Minerals as Adsorbents of Aflatoxin M1 from Contaminated Milk and Effects on Milk Quality." *Applied Clay Science* 88–89:92–99. doi: 10.1016/j.clay.2013.11.028.

CE. 2006. "Modes De Prélèvement Des Échantillons Pour Le Contrôle Officiel Des Teneurs En Mycotoxines Des Denrées Alimentaires." *Annexe I* 2006(1):12–34.

Chakroun, Yasmine, Souheib Oueslati, Laetitia Pinson-gadais, Manef Abderrabba, and Jean Michel Savoie. 2022. "Characterization of Fusarium Acuminatum: A Potential Enniatins Producer in Tunisian Wheat." *Journal of Fungi* 8(5). doi: 10.3390/jof8050458.

Chandra, Joya, Afshin Samali, and Sten Orrenius. 2000. "Triggering and Modulation of Apoptosis by Oxidative Stress." *Free Radical Biology and Medicine* 29(3–4):323–33. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00302-6.

Chen, Bo, Yanlei Sun, Feifei Luo, and Chengshu Wang. 2020. "Bioactive Metabolites and Potential Mycotoxins Produced by Cordyceps Fungi: A Review of Safety." *Toxins* 12(6):1–13. doi: 10.3390/toxins12060410.

Choi, K. C., W. T. Chung, J. K. Kwon, J. Y. Yu, Y. S. Jang, S. M. Park, S. Y. Lee, and J. C. Lee. 2010. "Inhibitory Effects of Quercetin on Aflatoxin B1-Induced Hepatic Damage in Mice." *Food and Chemical Toxicology* 48(10):2747–53.

Chung, Hachung, Sünje J. Pamp, Jonathan A. Hill, Neeraj K. Surana, Sanna M. Edelman, Erin B. Troy, Nicola C. Reading, Eduardo J. Villablanca, Sen Wang, and Jorge R. Mora. 2012. "Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota." *Cell* 149(7):1578–93.

Chung, T. K., J. W. Erdman, and D. H. Baker. 1990. "Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate: Effects on Zinc, Manganese, Vitamin A, and Riboflavin Utilization." *Poultry Science* 69(8):1364–70. doi: 10.3382/ps.0691364.

Ciapetti, G., E. Cenni, L. Pratelli, and A. Pizzoferrato. 1993. "In Vitro Evaluation of Cell/Biomaterial Interaction by MTT Assay." *Biomaterials*. doi: 10.1016/0142-9612(93)90055-7.

Clemente, Jose C., Luke K. Ursell, Laura Wegener Parfrey, and Rob Knight. 2012. "The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View." *Cell* 148(6):1258–70.

Cleveland, Thomas E., Patrick F. Dowd, Anne E. Desjardins, Deepak Bhatnagar, and Peter J. Cotty. 2003. "United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service Research on Pre-Harvest Prevention of Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in US Crops." *Pest Management Science* 59(6–7):629–42. doi: 10.1002/ps.724.

Combes, S., L. Fortun-Lamothe, L. Cauquil, and T. Gidenne. 2011. "Piloter l'écosystème Digestif Du Lapin: Pourquoi, Quand et Comment." *Proc.: 14e Journées de La Recherche Cunicole, 22-23 November, 2011. Le Mans, France. 33* 48.

Commission, Recommandation D. E. L. A. 2013. "L 91/12." 9(7):2011–14. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2481.Disponible.

Costa, Stefano, Anelì Utan, Ester Speroni, Rinaldo Cervellati, Gianfranco Piva, Aldo Prandini, and Maria Clelia Guerra. 2007. "Carnosic Acid from Rosemary Extracts : A Potential Chemoprotective Agent against Aflatoxin B1 . An in Vitro Study." *J Appl Toxicol* 27(2):152–59. doi: 10.1002/jat.

Cotter, Paul D., Colin Hill, and R. Paul Ross. 2005. "Food Microbiology: Bacteriocins: Developing Innate Immunity for Food." *Nature Reviews Microbiology* 3(10):777.

Cotty, Peter J., and Ramon Jaime-Garcia. 2007. "Influences of Climate on Aflatoxin Producing Fungi and Aflatoxin Contamination." *International Journal of Food Microbiology* 119:109–15. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.060.

Creppy, Edmond E. 2002. "Update of Survey, Regulation and Toxic Effects of Mycotoxins in Europe." Pp. 19–28 in *Toxicology Letters*.

Dalié, D. K. D., A. M. Deschamps, and F. Richard-Forget. 2010. "Lactic Acid Bacteria - Potential for Control of Mould Growth and Mycotoxins: A Review." *Food Control* 370–80.

Daou, Rouaa, Karine Joubrane, Lydia Rabbaa Khabbaz, Richard G. Maroun, Ali Ismail, and André El Khoury. 2021. "Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Imported and Lebanese Wheat and -Products." *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 14(3):227–35. doi: 10.1080/19393210.2021.1933203.

Deepthy, R., and S. Balakrishnan. 2005. "Climatic Control on Clay Mineral Formation: Evidence from Weathering Profiles Developed on Either Side of the Western Ghats." *Journal of Earth System Science* 114(5):545–56. doi: 10.1007/BF02702030.

Ding, Xiaoxia, Linxia Wu, Peiwu Li, Zhaowei Zhang, Haiyan Zhou, Yizhen Bai, Xiaomei

Chen, and Jun Jiang. 2015. “Risk Assessment on Dietary Exposure to Aflatoxin B1 in Post-Harvest Peanuts in the Yangtze River Ecological Region.” *Toxins* 7:4157–74. doi: 10.3390/toxins7104157.

Ding, Xunshan, Kristin Lichti, and Jeff L. Staudinger. 2006. “The Mycoestrogen Zearalenone Induces CYP3A through Activation of the Pregnane X Receptor.” *Toxicological Sciences* 91(2):448–55. doi: 10.1093/toxsci/kfj163.

Doi, Kunio, and Koji Uetsuka. 2014. “Mechanisms of Mycotoxin-Induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis through Oxidative Stress-Related Pathways.” *Journal of Toxicologic Pathology* 27(1):1–10. doi: 10.1293/tox.2013-0062.

Dong, Mei, Phitsanu Tulayakul, Jun-You Li, Ke-Su Dong, Noboru Manabe, and Susumu Kumagai. 2010. “Metabolic Conversion of Zearalenone to Alpha-Zearalenol by Goat Tissues.” *The Journal of Veterinary Medical Science* 72(3):307–12.

Dornetshuber, Rita, Petra Heffeter, Rosa Lemmens-Gruber, Leonilla Elbling, Doris Marko, Michael Micksche, and Walter Berger. 2009. “Oxidative Stress and DNA Interactions Are Not Involved in Enniatin- and Beauvericin-Mediated Apoptosis Induction.” *Molecular Nutrition and Food Research* 53:1112–22. doi: 10.1002/mnfr.200800571.

Doyle, M. P., and E. H. Marth. 1978. “Bisulfite Degrades Aflatoxin : Effect of Temperature and Concentration of Bisulfite.” 41(10):774–80.

Drider, Djamel, Gunnar Fimland, Yann He, and Lynn M. Mcmullen. 2006. “The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins.” 70(2):564–82. doi: 10.1128/MMBR.00016-05.

Duarte, Sofia C., Celeste M. Lino, and Angelina Pena. 2012. “Food Safety Implications of Ochratoxin A in Animal-Derived Food Products.” *Veterinary Journal* 192(3):286–92. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.11.002.

Edite Bezerra da Rocha, Maria, Francisco da Chagas Oliveira Freire, Fábio Erlan Feitosa Maia, Maria Izabel Florindo Guedes, and Davide Rondina. 2014. “Mycotoxins and Their Effects on Human and Animal Health.” *Food Control* 159–65.

EFSA. 2014. “Scientific Opinion on the Risks for Public Health Related to the Presence of Zearalenone in Food.” *EFSA Journal* 12(3869):1–117. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2197.Available.

Van Egmond, Hans P., Ronald C. Schothorst, and Marco A. Jonker. 2007. “Regulations Relating to Mycotoxins in Food : PPPPerspectives in a Global and European Context.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 147–57.

El-Desouky, T. A., and K. Naguib. 2013. “Occurrence of Zearalenone Contamination in Some Cereals in Egypt.” *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 12(23):25.

El-nekeety, Aziza A., Sherif R. Mohamed, Amal S. Hathout, Nabila S. Hassan, Soher E. Aly, and Mosaad A. Abdel-wahhab. 2011. “Toxicon Antioxidant Properties of Thymus Vulgaris Oil against a Fl Atoxin-Induce Oxidative Stress in Male Rats.” *Toxicon* 57(7–8):984–91. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.03.021.

El-nekeety, Aziza A., Ridha Oueslati, and Mosaad A. Abdel-wahhab. 2018. “Lactobacillus Plantarum Alleviate Aflatoxins (B1 and M1) Induced Disturbances in the Intestinal Genes Expression and DNA Fragmentation in Mice.” *Toxicon*. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.03.008.

El-Nekeety, Aziza A., Asmaa S. Salman, Amal S. Hathout, Bassem A. Sabry, Sekena H. Abdel-Aziem, Nabila S. Hassan, and Mosaad A. Abdel-Wahhab. 2017. “Evaluation of the Bioactive Extract of Actinomyces Isolated from the Egyptian Environment against Aflatoxin B1-Induce Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress in the Liver of Rats.” *Food and Chemical Toxicology* 105:241–55. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.024.

El-Nezami, Hani, Nektaria Polychronaki, Yuan Kun Lee, Carolyn Haskard, Risto Juvonen, Seppo Salminen, and Hannu Mykkänen. 2004. “Chemical Moieties and Interactions Involved in the Binding of Zearalenone to the Surface of Lactobacillus Rhamnosus

Strains GG." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(14):4577–81.
El-Nezami, Hani, Nektaria Polychronaki, Seppo Salminen, and Hannu Mykkänen. 2002. "Binding Rather than Metabolism May Explain the Interaction of Two Food-Grade Lactobacillus Strains with Zearalenone and Its Derivative ά-Zearalenol." *Applied and Environmental Microbiology* 68(7):3545–49. doi: 10.1128/AEM.68.7.3545-3549.2002.
El-Bahr, S. M. 2015. "Effect of Curcumin on Hepatic Antioxidant Enzymes Activities and Gene Expressions in Rats Intoxicated with Aflatoxin B1." *Phytotherapy Research* 29(1):134–40.
Elsanhoty, Rafaat M., Samir Ahmed Salam, Mohamed Fawzy Ramadan, and Farid H. Badr. 2014. "Detoxification of Aflatoxin M1 in Yoghurt Using Probiotics and Lactic Acid Bacteria." *Food Control* 43:129–34. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.03.002.
Everett, D. J., C. J. Perry, K. A. Scott, B. W. Martin, and M. K. Terry. 1987. "Estrogenic Potencies of Resorcylic Acid Lactones and 17ß-Estradiol in Female Rats." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 20(4):435–43. doi: 10.1080/15287398709530995.
Ezdini, Khawla, Jalila Ben Salah-Abbès, Héla Belgacem, Marwa Mannai, and Samir Abbès. 2020. "Lactobacillus Paracasei Alleviates Genotoxicity, Oxidative Stress Status and Histopathological Damage Induced by Fumonisin B1 in BALB/c Mice." *Toxicon* 185:46–56. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.06.024.
Felis, Giovanna E., and Franco Dellaglio. 2007. "Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria." *Current Issues in Intestinal Microbiology*.
Fernández-Blanco, Celia, Guillermina Font, and Maria Jose Ruiz. 2016. "Interaction Effects of Enniatin B, Deoxinivalenol and Alternariol in Caco-2 Cells." *Toxicology Letters* 241:38–48. doi: 10.1016/j.toxlet.2015.11.005.
Ficheux, A. S., Y. Sibiril, and D. Parent-Massin. 2013. "Effects of Beauvericin, Enniatin b and Moniliformin on Human Dendritic Cells and Macrophages: An Invitro Study." *Toxicon* 71:1–10. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.04.024.
Fink-Gremmels, J., and H. Malekinejad. 2007. "Clinical Effects and Biochemical Mechanisms Associated with Exposure to the Mycoestrogen Zearalenone." *Animal Feed Science and Technology* 326–41.
Fink-Gremmels, Johanna. 2008. "Mycotoxins in Cattle Feeds and Carry-over to Dairy Milk: A Review." *Food Additives and Contaminants* 25(2):172–80.
Firmin, Stéphane. 2011. "Efficacité de Détoxication de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A Par Un Adsorbant Organique: Évaluation Par La Balance d'excrétion et Les Paramètres Toxicocinétiques Chez Le Rat et La Brebis Laitière."
Fisher, Matthew C., Daniel A. Henk, Cheryl J. Briggs, John S. Brownstein, Lawrence C. Madoff, Sarah L. McCraw, and Sarah J. Gurr. 2012. "Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health." *Nature* 484(7393):186.
Föllmann, Wolfram, Claudia Behm, and Gisela H. Degen. 2009. "The Emerging Fusarium Toxin Enniatin B: In-Vitro Studies on Its Genotoxic Potential and Cytotoxicity in V79 Cells in Relation to Other Mycotoxins." *Mycotoxin Research* 25:11–19. doi: 10.1007/s12550-008-0002-y.
Fraeyman, Sophie, Siska Croubels, Mathias Devreese, and Gunther Antonissen. 2017. "Emerging Fusarium and Alternaria Mycotoxins: Occurrence, Toxicity and Toxicokinetics." *Toxins* 9(7):1–26. doi: 10.3390/toxins9070228.
Frizzell, Caroline, Silvio Uhlig, Christopher O. Miles, Steven Verhaegen, Christopher T. Elliott, Gunnar S. Eriksen, Morten Sørlie, Erik Ropstad, and Lisa Connolly. 2015. "Biotransformation of Zearalenone and Zearalenols to Their Major Glucuronide Metabolites Reduces Estrogenic Activity." *Toxicology in Vitro* 29(3):575–81. doi: 10.1016/j.tiv.2015.01.006.
GALTIER, Pierre, Nicolas LOISEAU, Isabelle Paule OSWALD, and Olivier PUEL. 2006.

"Toxicologie Des Mycotoxines: Dangers et Risques En Alimentation Humaine et Animale." *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*.

Galtier, Pierre, Nicolas Loiseau, Isabelle Paule, and Olivier Puel. 2006. "Toxicologie Des Mycotoxines : Dangers et Risques En Alimentation Humaine et Animale Toxicology of Mycotoxins , Hazards and Risks In." (1):5–14.

Galvano, Fabio, Andrea Piva, Alberto Ritieni, and Giacomo Galvano. 2001. "Dietary Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins : A Review." 64(1):120–31.

Gammelsrud, A., A. Solhaug, B. Dendelé, W. J. Sandberg, L. Ivanova, A. Kocbach Bølling, D. Lagadic-Gossmann, M. Refsnes, R. Becher, G. Eriksen, and J. A. Holme. 2012. "Enniatin B-Induced Cell Death and Inflammatory Responses in RAW 267.4 Murine Macrophages." *Toxicology and Applied Pharmacology* 261(1):74–87. doi: 10.1016/j.taap.2012.03.014.

Gao, Xin, Lvhui Sun, Niya Zhang, Chong Li, Jiacai Zhang, Zhuohui Xiao, and Desheng Qi. 2017. "Gestational Zearalenone Exposure Causes Reproductive and Developmental Toxicity in Pregnant Rats and Female Offspring." *Toxins* 9(1):21. doi: 10.3390/toxins9010021.

Gareau, Mélanie G., Philip M. Sherman, and W. Allan Walker. 2010. "Probiotics and the Gut Microbiota in Intestinal Health and Disease." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 7(9):503.

Gaumy, J. L., J. D. Bailly, and V. Burgat P. Guerre. 2001. "Zéaralénone : Propriétés et Toxicité Expérimentale." *Revue Médecine Vétérinaire* 152(3):219–34.

Gautier, Charlotte, Laetitia Pinson-Gadais, and Florence Richard-Forget. 2020. "Fusarium Mycotoxins Enniatins: An Updated Review of Their Occurrence, the Producing Fusarium Species, and the Abiotic Determinants of Their Accumulation in Crop Harvests." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(17):4788–98. doi: 10.1021/acs.jafc.0c00411.

Ge, Junhua, Haichu Yu, Jian Li, Zhexun Lian, Hongjing Zhang, Hao Fang, and Lusha Qian. 2017. "Assessment of Aflatoxin B1 Myocardial Toxicity in Rats: Mitochondrial Damage and Cellular Apoptosis in Cardiomyocytes Induced by Aflatoxin B1." *Journal of International Medical Research* 45(3):1015–23.

Ghali, R., K. Hmaissia-khlifa, H. Ghorbel, K. Maaroufi, and A. Hedili. 2008. "Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Tunisian Foods." *Food Control* 19(9):921–24. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.09.003.

Ghali, Ridha, Karima H. Khlifa, Hayat Ghorbel, Khira Maaroufi, and Abderrazak Hedilli. 2010. "Aflatoxin Determination in Commonly Consumed Foods in Tunisia." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(14):2347–51. doi: 10.1002/jsfa.4069.

Gholami-Ahangaran, Majid, Nader Rangsaz, and Shahrzad Azizi. 2016. "Evaluation of Turmeric (Curcuma Longa) Effect on Biochemical and Pathological Parameters of Liver and Kidney in Chicken Aflatoxicosis." *Pharmaceutical Biology* 54(5):780–87.

Gill, Harsharn, and Jaya Prasad. 2008. "Probiotics, Immunomodulation, and Health Benefits." Pp. 423–54 in *Bioactive components of milk*. Springer.

Goldes, S. A., H. W. Ferguson, R. D. Moccia, and P-Y Daoust. 1988. "Histological Effects of the Inert Suspended Clay Kaolin on the Gills of Juvenile Rainbow Trout, Salmo Gairdneri Richardson." *Journal of Fish Diseases* 11(1):23–33.

Gratz, S., Q. K. Wu, R. O. Juvonen, H. Mykka, and P. C. Turner. 2007. "Lactobacillus Rhamnosus Strain GG Reduces Aflatoxin B 1 Transport , Metabolism , and Toxicity in Caco-2 Cells □." 73(12):3958–64. doi: 10.1128/AEM.02944-06.

Grenier, Bertrand, Ana Paula Loureiro-Bracarense, Joelma Lucioli, Graziela Drociunas Pacheco, Anne Marie Cossalter, Wulf Dieter Moll, Gerd Schatzmayr, and Isabelle P. Oswald. 2011. "Individual and Combined Effects of Subclinical Doses of

Deoxynivalenol and Fumonisins in Piglets." *Molecular Nutrition and Food Research* 55(5):761–71. doi: 10.1002/mnfr.201000402.

Guarino, Alfredo, and Antonietta Giannattasio. 2011. "New Molecular Approaches in the Diagnosis of Acute Diarrhea: Advantages for Clinicians and Researchers." *Current Opinion in Gastroenterology* 27(1):24–29.

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." *Revue Méd. Vét* 151(12):1095–1106.

Gupta, Rajnish A., and Raymond N. DuBois. 2001. "Colorectal Cancer Prevention and Treatment by Inhibition of Cyclooxygenase-2." *Nature Reviews Cancer* 1(1):11.

Hajjaji, Abdelouahed, Mostafa El Otmani, Driss Bouya, Amina Bouseta, Florence Mathieu, Sonia Collin, and Ahmed Lebrihi. 2006. "Occurrence of Mycotoxins (Ochratoxin A, Deoxynivalenol) and Toxigenic Fungi in Moroccan Wheat Grains: Impact of Ecological Factors on the Growth and Ochratoxin A Production." Pp. 494–99 in *Molecular Nutrition and Food Research*.

Hamid, Abdu Selim, Isaias Goitom Tesfamariam, Yucheng Zhang, and Zhen Gui Zhang. 2013. "Aflatoxin B1-Induced Hepatocellular Carcinoma in Developing Countries: Geographical Distribution, Mechanism of Action and Prevention." *Oncology Letters* 5(4):1087–92.

Hanelt, D., J. Li, and W. Nultsch. 1994. "Tidal Dependence of Photoinhibition of Photosynthesis in Marine Macrophytes of the South China Sea." *Botanica Acta*. doi: 10.1111/j.1438-8677.1994.tb00410.x.

Haskard, Carolyn A., Hani S. El-Nezami, Pasi E. Kankaanpää, Seppo Salminen, and Jorma T. Ahokas. 2001. "Surface Binding of Aflatoxin B 1 by Lactic Acid Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):3086–91. doi: 10.1128/AEM.67.7.3086-3091.2001.

Haskard, Carolyn, Charlotte Binnion, and Jorma Ahokas. 2000. "Factors Affecting the Sequestration of Aflatoxin by Lactobacillusrhamnosus Strain GG." *Chemico-Biological Interactions* 128(1):39–49.

Hathout, Amal S., Shaaban M. Abel-Fattah, Yehia H. Abou-Sree, and Ahmed S. M. Fouzy. 2020. "Incidence and Exposure Assessment of Aflatoxins and Ochratoxin A in Egyptian Wheat." *Toxicology Reports* 7:867–73. doi: 10.1016/j.toxrep.2020.07.003.

Hathout, Amal S., and Soher E. Aly. 2014. "Biological Detoxification of Mycotoxins: A Review." *Annals of Microbiology* 64(3):905–19.

Hathout, Amal S., Sherif R. Mohamed, Aziza A. El-nekeety, Nabila S. Hassan, Soher E. Aly, and Mosaad A. Abdel-wahhab. 2011. "Toxicon Ability of Lactobacillus Casei and Lactobacillus Reuteri to Protect against Oxidative Stress in Rats Fed a Fl Atoxins-Contaminated Diet." *Toxicon* 58(2):179–86. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.015.

Hell, Kerstin, Pascal Fandohan, Ranajit Bandyopadhyay, Sebastian Kiewnick, Richard Sikora, and Peter J. Cotty. 2008. "Pre- and Postharvest Management of Aflatoxin in Maize: An African Perspective." Pp. 219–29 in *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*.

Hilakivi-Clarke, Leena, Elizabeth Cho, and Robert Clarke. 1998. "Maternal Genistein Exposure Mimics the Effects of Estrogen on Mammary Gland Development in Female Mouse Offspring." *Oncology Reports* 5(3):609–25. doi: 10.3892/or.5.3.609.

Hinton, Dennis M., Michael J. Myers, Richard A. Raybourne, Sabine Francke-Carroll, Rene E. Sotomayor, Joseph Shaddock, Alan Warbritton, and Ming W. Chou. 2003. "Immunotoxicity of Aflatoxin B1 in Rats: Effects on Lymphocytes and the Inflammatory Response in a Chronic Intermittent Dosing Study." *Toxicological Sciences* 73(2):362–77.

Hmaissia Khlifa, K., R. Ghali, C. Mazigh, Z. Aouni, S. Machgoul, and A. Hedhili. 2012. "Ochratoxin A Levels in Human Serum and Foods from Nephropathy Patients in

Tunisia: Where Are You Now?" *Experimental and Toxicologic Pathology* 64(5):509–12. doi: 10.1016/j.etp.2010.11.006.

Hoffmans, Yvette, Sara Schaarschmidt, Carsten Fauhl-Hassek, and H. J. van der Fels-Klerx. 2022. "Factors during Production of Cereal-Derived Feed That Influence Mycotoxin Contents." *Toxins* 14(5):1–27. doi: 10.3390/toxins14050301.

Holmes, Elaine, Jia V Li, Julian R. Marchesi, and Jeremy K. Nicholson. 2012. "Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk." *Cell Metabolism* 16(5):559–64.

Hooper, Lora V, Dan R. Littman, and Andrew J. Macpherson. 2012. "Interactions between the Microbiota and the Immune System." *Science* 336(6086):1268–73.

Hu, Jin, Minglong Xu, Yujian Dai, Xiaolin Ding, Cheng Xiao, Hongjun Ji, and Yinxue Xu. 2016. "Exploration of Bcl-2 Family and Caspases-Dependent Apoptotic Signaling Pathway in Zearalenone-Treated Mouse Endometrial Stromal Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 476(4):553–59. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.161.

Humans, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to, International Agency for Research on Cancer, and World Health Organization. 1993. *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. Vol. 56. World Health Organization.

Humans, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to, and World Health Organization. 1987. *Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Vol. 7. World Health Organization.

Humans, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to, World Health Organization, and International Agency for Research on Cancer. 2002. *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*. World Health Organization.

Hussar, Piret, Martin Kärner, Tõnu Järveots, Lazo Pendovski, and R. Macedonia. 2016. "COMPARATIVE STUDY OF GLUCOSE TRANSPORTERS GLUT-2 AND GLUT-5 IN OSTRICHES GASTROINTESTINAL TRACT." 39(2):225–31.

Hussein, Hussein S., and Jeffrey M. Brasel. 2001. "Toxicity, Metabolism, and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals." *Toxicology* 101–34.

Imaoka, A., H. Setoyama, A. Takagi, S. Matsumoto, and Y. Umesaki. 2004. "Improvement of Human Faecal Flora-associated Mouse Model for Evaluation of the Functional Foods." *Journal of Applied Microbiology* 96(4):656–63.

Ingrassia, Isabelle, Antony Leplingard, and Arlette Darfeuille-michaud. 2005. "Lactobacillus Casei DN-114 001 Inhibits the Ability of Adherent-Invasive Escherichia Coli Isolated from Crohn ' s Disease Patients To Adhere to and To Invade Intestinal Epithelial Cells." 71(6):2880–87. doi: 10.1128/AEM.71.6.2880.

Ito, Akihiko, and Rota Wagai. 2017. "Global Distribution of Clay-Size Minerals on Land Surface for Biogeochemical and Climatological Studies." *Scientific Data* 4(1):1–11. doi: 10.1038/sdata.2017.103.

Jaehrig, Silke C., Sascha Rohn, Lother W. Kroh, Franz X. Wildenauer, Fred Lisdat, Lutz-Guenther Fleischer, and Tomas Kurz. 2008. "Antioxidative Activity of (1→ 3),(1→ 6)-β-d-Glucan from Saccharomyces Cerevisiae Grown on Different Media." *LWT-Food Science and Technology* 41(5):868–77.

Jebali, Ali, Seyed Ali Yasini Ardakani, Hossein Shahdadi, Mohammad Hossein Balal Zadeh, and Seyedhossein Hekmatimoghaddam. 2015. "Modification of Nanocellulose by Poly-Lysine Can Inhibit the Effect of Fumonisin B1 on Mouse Liver Cells." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 126:437–43. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.12.047.

Jebali, Rania, Samir Abbès, Jalila Ben Salah-Abbès, Ridha Ben Younes, Zohra Haous, and Ridha Oueslati. 2015. "Ability of Lactobacillus Plantarum MON03 to Mitigate

Aflatoxins (B1 and M1) Immunotoxicities in Mice." *Journal of Immunotoxicology* 12(3):290–99. doi: 10.3109/1547691X.2014.973622.

Jebali, Rania, Jalila Ben Salah-Abbès, Samir Abbès, Aziza M. Hassan, Sekena H. Abdel-Aziem, Aziza A. El-nekeety, Ridha Oueslati, and Mosaad A. Abdel-Wahhab. 2018. "Lactobacillus Plantarum Alleviate Aflatoxins (B1 and M1) Induced Disturbances in the Intestinal Genes Expression and DNA Fragmentation in Mice." *Toxicon* 146:13–23. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.03.008.

Jedidi, Ines, Alejandra Cruz, Maria Teresa González-Jaén, and Salem Said. 2017. "Aflatoxins and Ochratoxin A and Their Aspergillus Causal Species in Tunisian Cereals." *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 10(1):51–58. doi: 10.1080/19393210.2016.1247917.

Jedidi, Ines, Eva M. Mateo, Patricia Marín, Misericordia Jiménez, Salem Said, and María T. González-Jaén. 2021. "Contamination of Wheat, Barley, and Maize Seeds with Toxigenic Fusarium Species and Their Mycotoxins in Tunisia." *Journal of AOAC International* 104(4):959–67. doi: 10.1093/jaoacint/qsab020.

Jestoi, M. N., S. Paavanen-Huhtala, P. Parikka, and T. Yli-Mattila. 2008. "In Vitro and in Vivo Mycotoxin Production of Fusarium Species Isolated from Finnish Grains." *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41(8):545–58. doi: 10.1080/03235400600881547.

Jestoi, Marika. 2008. "Emerging Fusarium-Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, and Moniliformin - A Review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(1):21–49. doi: 10.1080/10408390601062021.

Jouany, Jean Pierre. 2007. "Methods for Preventing , Decontaminating and Minimizing the Toxicity of Mycotoxins in Feeds." 137:342–62. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009.

Juan, C., H. Berrada, J. Mañes, and S. Oueslati. 2017. "Multi-Mycotoxin Determination in Barley and Derived Products from Tunisia and Estimation of Their Dietary Intake." *Food and Chemical Toxicology* 103:148–56. doi: 10.1016/j.fct.2017.02.037.

Juan, C., A. Zinedine, L. Idrissi, and J. Mañes. 2008. "Ochratoxin A in Rice on the Moroccan Retail Market." *International Journal of Food Microbiology* 126(1–2):83–85. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.005.

Juodeikiene, Grazina, Joana Salomskiene, Dalia Eidukonyte, Daiva Vidmantiene, Vilma Narbutaite, and Lina Vaiciulyte-Funk. 2011. "The Impact of Novel Fermented Products Containing Extruded Wheat Material on the Quality of Wheat Bread." *Food Technology and Biotechnology* 49(4):502–10.

Kamada, Nobuhiko, and Gabriel Núñez. 2013. "Role of the Gut Microbiota in the Development and Function of Lymphoid Cells." *The Journal of Immunology* 190(4):1389–95.

Kanbur, Murat, Gökhan Eraslan, Zeynep Soyer Sarıca, and Öznur Aslan. 2011. "The Effects of Evening Primrose Oil on Lipid Peroxidation Induced by Subacute Aflatoxin Exposure in Mice." *Food and Chemical Toxicology* 49(9):1960–64.

Kang, Changgeun, Hyungkyoung Lee, Yong San Yoo, Do Yun Hah, Chung Hui Kim, Euikyung Kim, and Jong Shu Kim. 2013. "Evaluation of Oxidative DNA Damage Using an Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Comet Assay, and the Protective Effects of N-Acetylcysteine Amide on Zearalenone-Induced Cytotoxicity in Chang Liver Cells." *Toxicological Research* 29(1):43–52. doi: 10.5487/TR.2013.29.1.043.

Kankaanpää, Pasi, Elina Tuomola, Hani El-Nezami, Jorma Ahokas, and Seppo J. Salminen. 2000. "Binding of Aflatoxin B1 Alters the Adhesion Properties of Lactobacillus Rhamnosus Strain GG in a Caco-2 Model." *Journal of Food Protection* 63(3):412–14. doi: 10.4315/0362-028X-63.3.412.

Khalil, Ashraf A., Ashgan E. Abou-Gabal, Amira A. Abdellatef, and Ahmed E. Khalid. 2015.

"Protective Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria against Dietary Fumonisin B1-Induced Toxicity and DNA-Fragmentation in Sprague-Dawley Rats." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 45(6):530–50. doi: 10.1080/10826068.2014.940969.

Khediri, Faouzi, Abdennebi Ilhem Mrad, Moussadek Azzouz, Hedi Doughi, Taoufik Najjar, Hélène Mathiex-Fortunet, Philippe Garnier, and Antoine Cortot. 2011. "Efficacy of Diosmectite (Smecta)® in the Treatment of Acute Watery Diarrhoea in Adults: A Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Study." *Gastroenterology Research and Practice* 2011.

el Khoury, André E., and Ali Atoui. 2010. "Ochratoxin a: General Overview and Actual Molecular Status." *Toxins* 461–93.

Khoury, El. 2007. "Remerciements."

Kim, Il Hwan, Hwa Young Son, Sung Whan Cho, Chang Su Ha, and Boo Hyon Kang. 2003. "Zearalenone Induces Male Germ Cell Apoptosis in Rats." *Toxicology Letters* 138(3):185–92. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00405-8.

Kodali, Vidya Prabhakar, and Ramkrishna Sen. 2008. "Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of an Exopolysaccharide from a Probiotic Bacterium." *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* 3(2):245–51.

Kosicki, R., A. Błajet-Kosicka, J. Grajewski, and M. Twarużek. 2016. "Multiannual Mycotoxin Survey in Feed Materials and Feedingstuffs." *Animal Feed Science and Technology* 215:165–80.

Kovacs-Nolan, Jennifer, Prithy Rupa, Toshiro Matsui, Mitsuru Tanaka, Toru Konishi, Yusuke Sauchi, Kenji Sato, Shin Ono, and Yoshinori Mine. 2014. "In Vitro and Ex Vivo Uptake of Glutathione (GSH) across the Intestinal Epithelium and Fate of Oral GSH after in Vivo Supplementation." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(39):9499–9506.

Król, A., P. Pomastowski, K. Rafińska, V. Railean-Plugaru, J. Walczak, and B. Buszewski. 2018. "Microbiology Neutralization of Zearalenone Using Lactococcus Lactis and Bifidobacterium Sp." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-017-0555-8.

Kruis, W. 2004. "Antibiotics and Probiotics in Inflammatory Bowel Disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 20:75–78.

Kubena, L. F., T. S. Edrington, C. Kamps-Holtzapple, R. B. Harvey, M. H. Elissalde, and G. E. Rottinghaus. 1995. "Influence of Fumonisin B1, Present in Fusarium Moniliforme Culture Material, and T-2 Toxin on Turkey Poults." *Poultry Science* 74(2):306–13.

Lahouar, Amani, Ines Jedidi, Vicente Sanchis, and Salem Saïd. 2018. "Aflatoxin B1, Ochratoxin A and Zearalenone in Sorghum Grains Marketed in Tunisia." *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 11(2):103–10. doi: 10.1080/19393210.2018.1433239.

Lahtinen §, S. J., C. A. Haskard¶, A. C. Ouwehand §, S. J. Salminen §, and J. T. Ahokas. 2004. "Binding of Aflatoxin B1 to Cell Wall Components of Lactobacillus Rhamnosus Strain GG." *Food Additives and Contaminants* 21(2):158–64.

Landersjö, Clas, Zhennai Yang, Eine Huttunen, and Göran Widmalm. 2002. "Structural Studies of the Exopolysaccharide Produced by Lactobacillus Rhamnosus Strain GG (ATCC 53103)." *Biomacromolecules* 3(4):880–84. doi: 10.1021/bm020040q.

Landman, C., and E. Quévrain. 2016. "Le Microbiote Intestinal : Description, Rôle et Implication Physiopathologique." *Revue de Medecine Interne* 37(6):418–23.

Laurain, Julia, and Angeles Rodriguez. 2019. "Revue Des Stratégies de Détoxification En Mycotoxines de l ' Aliment." 51:79–86.

Leonard, Albert. 1994. "An Index to the Late Bronze Age Aegean Pottery from Syria-Palestine: Studies in Mediterranean Archaeology."

Ley, Ruth E., Daniel A. Peterson, and Jeffrey I. Gordon. 2006. "Ecological and Evolutionary

Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine." *Cell* 124(4):837–48.
Li, Jinyang, Wenbo Wang, Sifan Chen, Tao Shao, Xuxiong Tao, and Xianjun Yuan. 2021. "Effect of Lactic Acid Bacteria on the Fermentation Quality and Mycotoxins Concentrations of Corn Silage Infested with Mycotoxigenic Fungi." *Toxins* 13(10):699. doi: 10.3390/toxins13100699.
Lin, T. Y., C. W. Lin, and Y. J. Wang. 2003. "Production of Conjugated Linoleic Acid by Enzyme Extract of Lactobacillus Acidophilus CCRC 14079." *Food Chemistry* 83(1):27–31.
Linder, Ralph E., Rex A. Hess, and Lillian F. Strader. 1986. "Testicular Toxicity and Infertility in Male Rats Treated with 1, 3-Dinitrobenzene." *Journal of Toxicology and Environmental Health* 19(4):477–89. doi: 10.1080/15287398609530946.
Liu, Chin-Feng, and Tzu-Ming Pan. 2010. "In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity." *Journal of Food and Drug Analysis* 18(2).
Liu, Yan, and Felicia Wu. 2010. "Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment." *Environmental Health Perspectives* 118(6):818–24.
Long, Miao, Shuhua Yang, Shuang Dong, Xinliang Chen, Yi Zhang, and Jianbin He. 2017. "Characterization of Semen Quality, Testicular Marker Enzyme Activities and Gene Expression Changes in the Blood Testis Barrier of Kunming Mice Following Acute Exposure to Zearalenone." *Environmental Science and Pollution Research* 24(35):27235–43. doi: 10.1007/s11356-017-0299-1.
Long, Miao, Shuhua Yang, Yuan Wang, Peng Li, Yi Zhang, Shuang Dong, Xinliang Chen, Jiayi Guo, Jianbin He, Zenggui Gao, and Jun Wang. 2016. "The Protective Effect of Selenium on Chronic Zearalenone-Induced Reproductive System Damage in Male Mice." *Molecules* 21(12):E1687. doi: 10.3390/molecules21121687.
Lu, H., M. Fernández-Franzón, G. Font, and M. J. Ruiz. 2013. "Toxicity Evaluation of Individual and Mixed Enniatins Using an in Vitro Method with CHO-K1 Cells." *Toxicology in Vitro* 27(2):672–80. doi: 10.1016/j.tiv.2012.11.009.
Łuczaj, Wojciech, and ELŻBIETA Skrzydlewska. 2003. "DNA Damage Caused by Lipid Peroxidation Products." *Cell Mol Biol Lett* 8(2):391–413.
Luo, Xiaohu, Yuheng Zhai, Lijun Qi, Lihong Pan, Jing Wang, Jiali Xing, Ren Wang, Li Wang, Qingchuan Zhang, Kai Yang, and Zhengxing Chen. 2020. "Influences of Electron Beam Irradiation on the Physical and Chemical Properties of Zearalenone- And Ochratoxin A-Contaminated Corn and in Vivo Toxicity Assessment." *Foods* 9(3):1–13. doi: 10.3390/foods9030376.
Luttgeharm, Kyle D., Edgar B. Cahoon, and Jonathan E. Markham. 2016. "Substrate Specificity, Kinetic Properties and Inhibition by Fumonisin B1of Ceramide Synthase Isoforms from Arabidopsis." *Biochemical Journal* 473(5):563–603. doi: 10.1042/BJ20150824.
Maaroufi, Khira, Leila Chekir, Edmond Ekue Creppy, Farielle Ellouz, and Hassen Bacha. 1996. "Zearalenone Induces Modifications of Haematological and Biochemical Parameters in Rats." *Toxicon* 34(5):535–40. doi: 10.1016/0041-0101(96)00008-6.
Maatouk, Imed, Amel Mehrez, Aya Ben Amara, Ragoubi Chayma, Salwa Abid, Taieb Jerbi, and Ahmed Landoulsi. 2019. "Effects of Gamma Irradiation on Ochratoxin a Stability and Cytotoxicity in Methanolic Solutions and Potential Application in Tunisian Millet Samples." *Journal of Food Protection* 82(8):1433–39. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-557.
Madbouly, Adel K., Mohamed I. M. Ibrahim, Ahmed F. Sehab, and Mosaad A. Abdel-Wahhab. 2012. "Co-Occurrence of Mycoflora, Aflatoxins and Fumonisins in Maize and Rice Seeds from Markets of Different Districts in Cairo, Egypt." *Food Additives and*

Contaminants: Part B Surveillance 5(2):112–20. doi: 10.1080/19393210.2012.676078.
Madhyastha, M. S., R. R. Marquardt, and A. A. Frohlich. 1992. "Hydrolysis of Ochratoxin A by the Microbial Activity of Digesta in the Gastrointestinal Tract of Rats." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23:468–72. doi: 10.1007/BF00203811.
Magnussen, Arvin, and Mansour A. Parsi. 2013. "Aflatoxins, Hepatocellular Carcinoma and Public Health." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 19(10):1508.
Mahdjoubi, Choukri Khelifa, Natalia Arroyo-Manzanares, Nisserine Hamini-Kadar, Ana M. García-Campaña, Kihel Mebrouk, and Laura Gámiz-Gracia. 2020. "Multi-Mycotoxin Occurrence and Exposure Assessment Approach in Foodstuffs from Algeria." *Toxins* 12(3):194. doi: 10.3390/toxins12030194.
Malir, Frantisek, Vladimir Ostry, Annie Pfohl-Leszkowicz, Jan Malir, and Jakub Toman. 2016. "Ochratoxin A: 50 Years of Research." *Toxins* 191.
Mally, Angela. 2012. "Ochratoxin a and Mitotic Disruption: Mode of Action Analysis of Renal Tumor Formation by Ochratoxin A." *Toxicological Sciences* 127(2):315–30. doi: 10.1093/toxsci/kfs105.
Maranghi, Francesca, Roberta Tassinari, Laura Narciso, Sabrina Tait, Cinzia La Rocca, Gabriella Di Felice, Cinzia Butteroni, Silvia Corinti, Bianca Barletta, Eugenia Cordelli, Francesca Pacchierotti, Patrizia Eleuteri, Paola Villani, Ludovic Le Hegarat, Valérie Fessard, and Océane Reale. 2018. "In Vivo Toxicity and Genotoxicity of Beauvericin and Enniatins. Combined Approach to Study in Vivo Toxicity and Genotoxicity of Mycotoxins Beauvericin (BEA) and Enniatin B (ENNB)." *EFSA Supporting Publications* 15(5):1406E. doi: 10.2903/sp.efsa.2018.en-1406.
Marin-Kuan, M., V. Ehrlich, T. Delatour, C. Cavin, and B. Schilter. 2011. "Evidence for a Role of Oxidative Stress in the Carcinogenicity of Ochratoxin A." *Journal of Toxicology* 2011. doi: 10.1155/2011/645361.
Marin, S., A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, and V. Sanchis. 2013. "Mycotoxins: Occurrence, Toxicology, and Exposure Assessment." *Food and Chemical Toxicology*.
Marklund, Stefan, and Gudrun Marklund. 1974. "Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase." *European Journal of Biochemistry* 47(3):469–74.
Martín, R., E. Jiménez, M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez. 2006. "Lactobacillus Salivarius CECT 5713, a Potential Probiotic Strain Isolated from Infant Feces and Breast Milk of a Mother–Child Pair." *International Journal of Food Microbiology* 112(1):35–43.
Mayura, Kittane, Mosaad A. Abdel-wahhab, Kenneth S. Mckenzie, Ahmedoul B. Sarr, John F. Edwards, Khayria Naguib, Timothy D. Phillips, and Hidden Risks Mayura. 1998. "Prevention of Maternal and Developmental Toxicity in Rats via Dietary Inclusion of Common Aflatoxin Sorbents : Potential for Hidden Risks." 41(2):175–82.
Megalla, Samuel E., and Mohamed A. Mohran. 1984. "Fate of Aflatoxin B-1 in Fermented Dairy Products." *Mycopathologia* 88(1):27–29.
Mehrez, A., I. Maatouk, R. Romero-González, A. Ben Amara, M. Kraiem, A. Garrido Frenich, and A. Landoulsi. 2016. "Assessment of Ochratoxin A Stability Following Gamma Irradiation: Experimental Approaches for Feed Detoxification Perspectives." *World Mycotoxin Journal* 9(2):289–98. doi: 10.3920/WMJ2013.1652.
Meki, Abdel-Raheim M. A., Emade El-Dein F. Esmail, Ahmed A. Hussein, and Hamdy M. Hassanein. 2004. "Caspase-3 and Heat Shock Protein-70 in Rat Liver Treated with Aflatoxin B1: Effect of Melatonin." *Toxicon* 43(1):93–100.
Millstone, Erik, and Patrick van Zwanenberg. 2002. "The Evolution of Food Safety Policy-Making Institutions in the UK, EU and Codex Alimentarius." *Social Policy and Administration* 36(6):593–609. doi: 10.1111/1467-9515.t01-1-00306.

Mir, Shabir Ahmad, B. N. Dar, Manzoor Ahmad Shah, Sajad Ahmad Sofi, Afshan Mumtaz Hamdani, Carlos A. F. Oliveira, Motahareh Hashemi Moosavi, Amin Mousavi Khaneghah, and Anderson S. Sant'Ana. 2021. "Application of New Technologies in Decontamination of Mycotoxins in Cereal Grains: Challenges, and Perspectives." *Food and Chemical Toxicology* 148(January):111976. doi: 10.1016/j.fct.2021.111976.

Miraglia, M., H. J. P. Marvin, G. A. Kleter, P. Battilani, C. Brera, E. Coni, F. Cubadda, L. Croci, B. De Santis, S. Dekkers, L. Filippi, R. W. A. Hutjes, M. Y. Noordam, M. Pisante, G. Piva, A. Prandini, L. Toti, G. J. van den Born, and A. Vespermann. 2009. "Climate Change and Food Safety: An Emerging Issue with Special Focus on Europe." *Food and Chemical Toxicology* 47(5):1009–21. doi: 10.1016/j.fct.2009.02.005.

Mnif, Wissem, Jean Marc Pascussi, Arnaud Pillon, Aurélie Escande, Aghleb Bartegi, Jean Claude Nicolas, Vincent Cavaillès, Marie Josèphe Duchesne, and Patrick Balaguer. 2007. "Estrogens and Antiestrogens Activate HPXR." *Toxicology Letters* 170(1):19–29. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.11.016.

Moayyedi, Paul, Alexander Charles Ford, Nicholas J. Talley, Filippo Cremonini, Amy E. Foxx-Orenstein, Lawrence J. Brandt, and Eamonn M. M. Quigley. 2010. "The Efficacy of Probiotics in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review." *Gut* 59(3):325–32.

Mohamadzadeh, Mansour, Scott Olson, Warren V Kalina, Gordon Ruthel, Gretchen L. Demmin, Kelly L. Warfield, Sina Bavari, and Todd R. Klaenhammer. 2005. "Lactobacilli Activate Human Dendritic Cells That Skew T Cells toward T Helper 1 Polarization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(8):2880–85.

Mokoena, Mduduzi P., Paul K. Chelule, and Nceba Gqaleni. 2005. "Reduction of Fumonisin B1 and Zearalenone by Lactic Acid Bacteria in Fermented Maize Meal." *Journal of Food Protection* 68(10):2095–99. doi: 10.4315/0362-028X-68.10.2095.

Moreau, Stéphane, and Mikaël Lev. 2014. "Highly Sensitive and Rapid Simultaneous Method for 45 Mycotoxins in Baby Food Samples by HPLC-MS / MS Using Fast Polarity Switching." 1(7):1–7.

Moslehi-Jenabian, Saloomeh, Line Lindegaard Pedersen, and Lene Jespersen. 2010. "Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health." *Nutrients* 2:449–73.

Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65(1–2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Murphy, Patricia A., Suzanne Hendrich, Cindy Landgren, and Cory M. Bryant. 2006. "Food Mycotoxins: An Update." *Journal of Food Science* R51.

Ben Mustapha, Maha, Mehrez Bousselmi, Taïeb Jerbi, Nasreddine Ben Bettaïeb, and Sami Fattouch. 2014. "Gamma Radiation Effects on Microbiological, Physico-Chemical and Antioxidant Properties of Tunisian Millet (Pennisetum Glaucum L.R.Br.)." *Food Chemistry* 154(2014):230–37. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.015.

Niderkorn, V., H. Boudra, and D. P. Morgavi. 2006. "Binding of Fusarium Mycotoxins by Fermentative Bacteria in Vitro." *Journal of Applied Microbiology* 101(4):849–56. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x.

Niderkorn, V., D. P. Morgavi, E. Pujos, A. Tissandier, and H. Boudra. 2007. "Screening of Fermentative Bacteria for Their Ability to Bind and Biotransform Deoxynivalenol, Zearalenone and Fumonisins in an in Vitro Simulated Corn Silage Model." *Food Additives and Contaminants* 24(4):406–15. doi: 10.1080/02652030601101110.

Niderkorn, Vincent, Diego Pablo Morgavi, Estelle Pujos, Antoine Tissandier, and Hamid Boudra. 2007. "Screening of Fermentative Bacteria for Their Ability to Bind and Biotransform Deoxynivalenol, Zearalenone and Fumonisins in an in Vitro Simulated

Corn Silage Model." *Food Additives and Contaminants* 24(4):406–15.
Ntasiou, Panagiota, Charalampos Myresiotis, Sotiris Konstantinou, Euphemia Papadopoulou-Mourkidou, and George S. Karaoglanidis. 2015. "Identification, Characterization and Mycotoxigenic Ability of Alternaria Spp. Causing Core Rot of Apple Fruit in Greece." *International Journal of Food Microbiology* 197:22–29. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.008.
O'Hara, Ann M., and Fergus Shanahan. 2006. "The Gut Flora as a Forgotten Organ." *EMBO Reports* 7(7):688–93.
Obremski, K., M. Gajęcki, W. Zwierzchowski, Ł. Zielonka, I. Otrocka-Domagała, T. Rotkiewicz, A. Mikołajczyk, M. Gajęcka, and M. Polak. 2003. "Influence of Zearalenone on Reproductive System Cell Proliferation in Gilts." *Polish Journal of Veterinary Sciences* 6(4):239–45.
Oikonomou, Georgios, Andre Gustavo Vieira Teixeira, Carla Foditsch, Marcela Lucas Bicalho, Vinicius Silva Machado, and Rodrigo Carvalho Bicalho. 2013. "Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S RDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth." *PloS One* 8(4):e63157.
Olleik, Hamza, Cendrine Nicoletti, Mickael Lafond, Elise Courvoisier-Dezord, Peiwen Xue, Akram Hijazi, Elias Baydoun, Josette Perrier, and Marc Maresca. 2019. "Comparative Structure-Activity Analysis of the Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of the Fungal Cyclohexadepsipeptides Enniatins and Beauvericin." *Toxins* 11(19):514. doi: 10.3390/toxins11090514.
Ostry, Vladimir, Frantisek Malir, Martina Cumova, Veronika Kyrova, Jakub Toman, Yann Grosse, Marketa Pospichalova, and Jiri Ruprich. 2018. "Investigation of Patulin and Citrinin in Grape Must and Wine from Grapes Naturally Contaminated by Strains of Penicillium Expansum." *Food and Chemical Toxicology* 118(June):805–11. doi: 10.1016/j.fct.2018.06.022.
Otim, Maxwell O., G. Mukiibi-Muka, Henrik Christensen, and Magne Bisgaard. 2005. "Aflatoxicosis, Infectious Bursal Disease and Immune Response to Newcastle Disease Vaccination in Rural Chickens." *Avian Pathology* 34(4):319–23. doi: 10.1080/03079450500179327.
Oueslati, S., H. Berrada, A. Juan-García, J. Mañes, and Cristina Juan. 2020. "Multiple Mycotoxin Determination on Tunisian Cereals-Based Food and Evaluation of the Population Exposure." *Food Analytical Methods* 13(6):1271–81. doi: 10.1007/s12161-020-01737-z.
Oueslati, Souheib, Guiseppe Meca, Ahmed Mliki, Abdelwahed Ghorbel, and Jordi Mañes. 2011. "Determination of Fusarium Mycotoxins Enniatins, Beauvericin and Fusaproliferin in Cereals and Derived Products from Tunisia." *Food Control* 22(8):1373–77. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.02.015.
Oueslati, Souheib, Roberto Romero-González, Salma Lasram, Antonia Garrido Frenich, and José Luis Martínez Vidal. 2012. "Multi-Mycotoxin Determination in Cereals and Derived Products Marketed in Tunisia Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry." *Food and Chemical Toxicology* 50(7):2376–81. doi: 10.1016/j.fct.2012.04.036.
Ouwehand, Arthur C., Tarja Suomalainen, Satu Tölkkö, and Seppo Salminen. 2002. "In Vitro Adhesion of Propionic Acid Bacteria to Human Intestinal Mucus." *Le Lait* 82(1):123–30.
Ozden, Sibel, Ayse Sibel Akdeniz, and Buket Alpertunga. 2012. "Occurrence of Ochratoxin A in Cereal-Derived Food Products Commonly Consumed in Turkey." *Food Control* 25(1):69–74. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.10.015.
Pang, Jian, Qingsong Zhou, Xiaofeng Sun, Lan Li, Bo Zhou, Fanchun Zeng, Yong Zhao, Wei

Shen, and Zhongyi Sun. 2017. "Effect of Low-Dose Zearalenone Exposure on Reproductive Capacity of Male Mice." *Toxicology and Applied Pharmacology* 333(15):60–67. doi: 10.1016/j.taap.2017.08.011.

Pankaj, S. K., Hu Shi, and Kevin M. Keener. 2018. "A Review of Novel Physical and Chemical Decontamination Technologies for Aflatoxin in Food." *Trends in Food Science and Technology* 73–83.

Park, Douglas L. 1993. "Perspectives on Mycotoxin Decontamination Procedures." *Food Additives & Contaminants* 10(1):49–60.

PARRY, D. W., P. JENKINSON, and L. McLEOD. 1995. "Fusarium Ear Blight (Scab) in Small Grain Cereals—a Review." *Plant Pathology* 44(2):207–38. doi: 10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x.

Paterson, Robert R. M., and Nelson Lima. 2010. "Toxicology of Mycotoxins." *EXS* 31–63.

Peltonen, Karita D., Hani S. El-Nezami, Seppo J. Salminen, and Jorma T. Ahokas. 2000. "Binding of Aflatoxin B1 by Probiotic Bacteria." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(13):1942–45.

Petzinger, E., and A. Weidenbach. 2002. "Mycotoxins in the Food Chain: The Role of Ochratoxins." *Livestock Production Science* 76(3):245–50.

Pfeiffer, Erika, Andreas Hildebrand, Hannes Mikula, and Manfred Metzler. 2010. "Glucuronidation of Zearalenone, Zeranol and Four Metabolites in Vitro: Formation of Glucuronides by Various Microsomes and Human Udp-Glucuronosyltransferase Isoforms." *Molecular Nutrition and Food Research* 54(10):1468–76. doi: 10.1002/mnfr.200900524.

Pfohl-Leszkowicz, A. 1999. "Métabolisation Des Mycotoxines-Effets Biologiques et Pathologies-Ecotoxicogenèse." *Dans Les Mycotoxines Dans l'alimentation: Évaluation et Gestion Du Risque. De Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. Technique et Documentation, Paris* 18–35.

Pfohl-Leszkowicz, A., T. Petkova-Bocharova, I. N. Chernozemsky, and M. Castegnaro. 2002. "Balkan Endemic Nephropathy and Associated Urinary Tract Tumours: A Review on Aetiological Causes and the Potential Role of Mycotoxins." *Food Additives and Contaminants* 22(3):163–69. doi: 10.1080/02652030110079815.

Pfohl-Leszkowicz, Annie, and Richard A. Manderville. 2007. "Ochratoxin A: An Overview on Toxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans." *Molecular Nutrition and Food Research* 51:61–99.

Phillips, Timothy D. 1999. "Dietary Clay in the Chemoprevention of Aflatoxin-Induced Disease." 52:118–26.

Phillips, Timothy D., A. Bashir Sarr, and Patrick G. Grant. 1995. "Selective Chemisorption and Detoxification of Aflatoxins by Phyllosilicate Clay." *Natural Toxins* 3(4):204–13.

Picard, Jean-Marc. 1994. "Ecrouissage Thermique Des Argiles Saturées: Application Au Stockage Des Déchets Radioactifs."

Pluske, John R. 2013. "Feed-and Feed Additives-Related Aspects of Gut Health and Development in Weanling Pigs." *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4(1):1.

Polychronaki, Nektaria, Robert M. West, Paul C. Turner, Hassan Amra, Mossad Abdel-wahhab, and Hannu Mykka. 2007. "A Longitudinal Assessment of Aflatoxin M 1 Excretion in Breast Milk of Selected Egyptian Mothers." 45:1210–15. doi: 10.1016/j.fct.2007.01.001.

Prado, G., J. E. G. Cruz Madeira, V. A. D. Morais, M. S. Oliveira, R. A. Souza, J. M. Peluzio, J. Godoy, J. F. M. Silva, and S. Piment. 2011. "Reduction of Aflatoxin B1 in Stored Peanuts (Arachis Hypogaea L.) Using Saccharomyces Cerevisiae." *Journal of Food Protection* 74(6):1003–6. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-380.

Prantera, C., M. L. Scribano, G. Falasco, A. Andreoli, and C. Luzi. 2002. "Ineffectiveness of

Probiotics in Preventing Recurrence after Curative Resection for Crohn's Disease: A Randomised Controlled Trial with Lactobacillus GG." *Gut* 51(3):405–9.

Preetha, S. P., M. Kanniappan, E. Selvakumar, M. Nagaraj, and P. Varalakshmi. 2006. "Lupeol Ameliorates Aflatoxin B1-Induced Peroxidative Hepatic Damage in Rats." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(3):333–39.

Preston, R. Julian, and Gary M. Williams. 2005. "DNA-Reactive Carcinogens: Mode of Action and Human Cancer Hazard." *Critical Reviews in Toxicology* 35(8–9):673–83.

Prosperini, A., G. Font, and M. J. Ruiz. 2014. "Interaction Effects of Fusarium Enniatins (A, A1, B and B1) Combinations on in Vitro Cytotoxicity of Caco-2 Cells." *Toxicology in Vitro*. doi: 10.1016/j.tiv.2013.06.021.

Prosperini, Alessandra, Houda Berrada, María José Ruiz, Francesca Caloni, Teresa Coccini, Leon J. Spicer, Maria Chiara Perego, and Alessandra Lafranconi. 2017. "A Review of the Mycotoxin Enniatin B." *Frontiers in Public Health* 304.

Qin, Guozhong, Prathima Gopalan-Kriczky, Jianjia Su, Yaoyu Ning, and Prabhakar D. Lotlikar. 1997. "Inhibition of Aflatoxin B1-Induced Initiation of Hepatocarcinogenesis in the Rat by Green Tea." *Cancer Letters* 112(2):149–54. doi: 10.1016/S0304-3835(96)04568-5.

Ramesh, V., R. V. Bhat, and S. Vasanthi. 2003. "Mycotoxin Food Safety Risk in Developing Countries." *Food Safety in Food Security and Food Trade*.

Regina Ferreira Geraldo Perdoncini, Márcia, Maria Josiane Sereia, Fabio Henrique Poliseli Scopel, Maysa Formigoni, Eliane Sloboda Rigobello, Stéfani Caroline Beneti, Flavia Aparecida Reitz Cardoso, Livia Benossi Marchi, Claudio Gomes da Silva Junior, Paula Gimenez Milani Fernandes, Tuan Henrique Smielevski de Souza, Priscila Wielewski, Erica Gomes de Lima, Angelivia Gregório, Maria Rosa Trentin Zorzenon, Juliana Cristina Castro, Vanessa de Cássia Mendes Del Bel, Magali Soares dos Santos Pozza, and Leila Larisa Medeiros Marques. 2020. "Growth of Fungal Cells and the Production of Mycotoxins." in *Cell Growth*.

Rharmitt, Sanae, Majida Hafidi, Hassan Hajjaj, Fabio Scordino, Domenico Giosa, Letterio Giuffrè, Davide Barreca, Giuseppe Criseo, and Orazio Romeo. 2016. "Molecular Characterization of Patulin Producing and Non-Producing Penicillium Species in Apples from Morocco." *International Journal of Food Microbiology* 217:137–40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.019.

Riba, A., S. Mokrane, F. Mathieu, A. Lebrihi, and N. Sabaou. 2008. "Mycoflora and Ochratoxin A Producing Strains of Aspergillus in Algerian Wheat." *International Journal of Food Microbiology* 122(1–2):85–92. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.057.

Riba, Amar, Noureddine Bouras, Salim Mokrane, Florence Mathieu, Ahmed Lebrihi, and Nasserdine Sabaou. 2010. "Aspergillus Section Flavi and Aflatoxins in Algerian Wheat and Derived Products." *Food and Chemical Toxicology* 48(10):2772–77. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.005.

Richard, J. L., G. A. Payne, A. E. Desjardin, C. Maragos, W. P. Norred, J. J. Pestka, T. D. Phillips, H. P. Van Egmond, P. J. Vardon, and T. B. Whitaker. n.d. "Ames, Iowa, USA: Council for Agricultural Science and Technology; 2003." *Mycotoxins, Risks in Plant, Animal and Human Systems. CAST Task Force Report* 139:101–3.

Richard, Jhon L., Gary A. Payne, Anne E. Desjardins, C. Maragos, W. P. Norred, and J. J. Pestka. 2003. "Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems." *CAST Task Force Report* 139:101–3.

Rist, V. T. S., M. Eklund, E. Bauer, N. Sauer, and R. Mosenthin. 2018. "Effect of Feeding Level on the Composition of the Intestinal Microbiota." (July):19–21. doi: 10.2527/jas52642.

Robert, Céline, and Annick Bernalier-Donadille. 2003. "The Cellulolytic Microflora of the Human Colon: Evidence of Microcrystalline Cellulose-Degrading Bacteria in Methane-Excreting Subjects." *FEMS Microbiology Ecology* 46(1):81–89.

Rodríguez-Carrasco, Yelko, María José Ruiz, Guillermina Font, and Houda Berrada. 2013. "Exposure Estimates to Fusarium Mycotoxins through Cereals Intake." *Chemosphere* 93(10):2297–2303. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.086.

Rogowska, A., P. Pomastowski, G. Sagandykova, and B. Buszewski. 2019. "Zearalenone and Its Metabolites: Effect on Human Health, Metabolism and Neutralisation Methods." *Toxicon* 46–56.

Rudolf, Krska., Hans. Pettersson, R. D. Josephs, M. Lemmens, S. Mac Donald, and E. Welzig. 2003. "Zearalenone in Maize: Stability Testing and Matrix Characterisation of a Certified Reference Material." *Food Additives and Contaminants* 20(12):1141–52. doi: 10.1080/02652030310001615203.

Rychen, Guido, Gabriele Aquilina, Giovanna Azimonti, Vasileios Bampidis, Maria de Lourdes Bastos, Georges Bories, Andrew Chesson, Pier Sandro Cocconcelli, Gerhard Flachowsky, Jürgen Gropp, Boris Kolar, Maryline Kouba, Marta López-Alonso, Alberto Mantovani, Baltasar Mayo, Fernando Ramos, Maria Saarela, Roberto Edoardo Villa, Robert John Wallace, Pieter Wester, Giovanna Martelli, Derek Renshaw, Gloria López-Gálvez, and Secundino López Puente. 2017. "Safety and Efficacy of Bentonite as a Feed Additive for All Animal Species." *EFSA Journal* 15(12). doi: 10.2903/j.efsa.2017.5096.

Ben Salah-Abbès, Jalila, Samir Abbès, Zohra Haous, and Ridha Oueslati. 2009. "Raphanus Sativus Extract Prevents and Ameliorates Zearalenone-Induced Peroxidative Hepatic Damage in Balb/c Mice." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61(11):1545–54. doi: 10.1211/jpp/61.11.0015.

Ben Salah-Abbès, Jalila, Samir Abbès, Zohra Houas, Mosaad A. Abdel-Wahhab, and Ridha Oueslati. 2008. "Zearalenone Induces Immunotoxicity in Mice: Possible Protective Effects of Radish Extract (Raphanus Sativus)." *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 60(6):761–70. doi: 10.1211/jpp.60.6.0012.

Salah-Abbès, Jalila Ben, Samir Abbès, Rania Jebali, Zohra Haous, and Ridha Oueslati. 2015. "Potential Preventive Role of Lactic Acid Bacteria against Aflatoxin M1immunotoxicity and Genotoxicity in Mice." *Journal of Immunotoxicology* 12(2):107–14. doi: 10.3109/1547691X.2014.904025.

Ben Salah-Abbes, Jalila, Samir Abbes, Rania Jebali, Zohra Haous, Ridha Oueslati, Jalila Ben Salah-Abbès, Samir Abbès, Rania Jebali, Zohra Haous, and Ridha Oueslati. 2015. "Potential Preventive Role of Lactic Acid Bacteria against Aflatoxin M1immunotoxicity and Genotoxicity in Mice." *Journal of Immunotoxicology* 12(2):107–14. doi: 10.3109/1547691X.2014.904025.

Ben Salah-Abbès, Jalila, Hela Belgacem, Khawla Ezzdini, Mosaad A. Abdel-Wahhab, and Samir Abbès. 2020. "Zearalenone Nephrotoxicity: DNA Fragmentation, Apoptotic Gene Expression and Oxidative Stress Protected by Lactobacillus Plantarum MON03." *Toxicon* 175:28–35. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.12.004.

Salah-Abbès, Jalila Ben, Rania Jebali, Hakimeh Sharafi, Kambiz Akbari Noghabi, Ridha Oueslati, and Samir Abbès. 2016. "Immuno-Physiological Alterations from AFB1 in Rats Counteracted by Treatments with Lactobacillus Paracasei BEJ01 and Montmorillonite Clay Mixture." *Journal of Immunotoxicology* 13(5):628–37. doi: 10.3109/1547691X.2016.1145157.

Salminen, Minna K., Soile Tynkkynen, Hilpi Rautelin, Maija Saxelin, Martti Vaara, Petri Ruutu, Seppo Sarna, Ville Valtonen, and Asko Ja. 2002. "Lactobacillus Bacteremia during a Rapid Increase in Probiotic Use of Lactobacillus Rhamnosus GG in Finland." 1155–60.

Sanchis, V., and N. Magan. 2004. "Environmental Conditions Affecting Mycotoxins." Pp. 174–89 in *Mycotoxins in Food*.

Saxelin, Maija, Soile Tynkkynen, Tiina Mattila-Sandholm, and Willem M. De Vos. 2005. "Probiotic and Other Functional Microbes: From Markets to Mechanisms." *Current Opinion in Biotechnology* 204–11.

Schaarschmidt, Sara, and Carsten Fauhl-Hassek. 2018. "The Fate of Mycotoxins During the Processing of Wheat for Human Consumption." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17(3):556–93. doi: 10.1111/1541-4337.12338.

Schaarschmidt, Sara, and Carsten Fauhl-Hassek. 2021. "The Fate of Mycotoxins during the Primary Food Processing of Maize." *Food Control* 107651.

Sedlak, Jozef, and Raymond H. Lindsay. 1968. "Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent." *Analytical Biochemistry* 25:192–205.

Serrano, A. B., G. Font, M. J. Ruiz, and E. Ferrer. 2012. "Co-Occurrence and Risk Assessment of Mycotoxins in Food and Diet from Mediterranean Area." *Food Chemistry* 135(2):423–29. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.064.

Sharma, Ricky A., and Peter B. Farmer. 2004. "Biological Relevance of Adduct Detection to the Chemoprevention of Cancer." 10:4901–12.

Shehata, Mohamed G., Ahmed N. Badr, Sobhy A. El Sohaimy, D. Asker, and Tarek S. Awad. 2019. "Characterization of Antifungal Metabolites Produced by Novel Lactic Acid Bacterium and Their Potential Application as Food Biopreservatives." *Annals of Agricultural Sciences* 64(1):71–78. doi: 10.1016/j.aoas.2019.05.002.

Shehata, Mohamed Gamal, Ahmed Noah Badr, and Sobhy Ahmed El Sohaimy. 2018. "Novel Antifungal Bacteriocin from Lactobacillus Paracasei KC39 with Anti-Mycotoxigenic Properties." *Bioscience Research* 15(4):4171–83.

Shyamal, S., P. G. Latha, S. R. Suja, V. J. Shine, G. I. Anuja, S. Sini, S. Pradeep, P. Shikha, and S. Rajasekharan. 2010. "Hepatoprotective Effect of Three Herbal Extracts on Aflatoxin B1-Intoxicated Rat Liver." *Singapore Medical Journal* 51(4):326.

Sjögren, Jörgen, Jesper Magnusson, Anders Broberg, Johan Schnürer, and Lennart Kenne. 2003. "Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from Lactobacillus Plantarum MiLAB 14." *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12):7554–57.

Sommer, Felix, and Fredrik Bäckhed. 2013. "The Gut Microbiota—Masters of Host Development and Physiology." *Nature Reviews Microbiology* 11(4):227.

Soriano, J. M., L. González, and A. I. Catalá. 2005. "Mechanism of Action of Sphingolipids and Their Metabolites in the Toxicity of Fumonisin B1." *Progress in Lipid Research* 345–56.

Srinivasan, K. R., and H. S. Fogler. 1990. "Use of Inorgano-Organo-Clays in the Removal of Priority Pollutants from Industrial Wastewaters: Adsorption of Benzo(a)Pyrene and Chlorophenols from Aqueous Solutions." *Clays & Clay Minerals* 38(3):287–93. doi: 10.1346/CCMN.1990.0380307.

Stob, Martin, R. S. Baldwin, John Tuite, F. N. Andrews, and K. G. Gillette. 1962. "Isolation of an Anabolic, Uterotrophic Compound from Corn Infected with Gibberella Zeae." *Nature* 196:1318. doi: 10.1038/1961318a0.

Stoev, S. D., M. F. Dutton, P. B. Njobeh, J. S. Mosonik, and P. A. Steenkamp. 2010. "Mycotoxic Nephropathy in Bulgarian Pigs and Chickens: Complex Aetiology and Similarity to Balkan Endemic Nephropathy." *Food Additives and Contaminants - Part A* 27(1):72–88. doi: 10.1080/02652030903207227.

Stoev, Stoycho D., Stefan Denev, Mike F. Dutton, Patrick B. Njobeh, Joseph S. Mosonik, Paul A. Steenkamp, and Iordan Petkov. 2010. "Complex Etiology and Pathology of Mycotoxic Nephropathy in South African Pigs." *Mycotoxin Research* 26(1):31–46. doi:

10.1007/s12550-009-0038-7.
Stubblefield, R. D., A. C. Pier, J. L. Richard, and O. L. Shotwell. 1983. "Fate of Aflatoxins in Tissues, Fluids, and Excrements from Cows Dosed Orally with Aflatoxin B1." *American Journal of Veterinary Research* 44(9):1750–52.
Štyriak, I., E. Conková, V. Kmec, J. Böhm, and E. Razzazi. 2001. "The Use of Yeast for Microbial Degradation of Some Selected Mycotoxins." *Mycotoxin Research* 17:24–27. doi: 10.1007/BF03036705.
Suzuki, Keiichiro, Seon-ah Ha, Masayuki Tsuji, and Sidonia Fagarasan. 2007. "Intestinal IgA Synthesis: A Primitive Form of Adaptive Immunity That Regulates Microbial Communities in the Gut." Pp. 127–35 in *Seminars in immunology*. Vol. 19. Elsevier.
Svingen, Terje, Niels Lund Hansen, Camilla Taxvig, Anne Marie Vinggaard, Udo Jensen, and Peter Have Rasmussen. 2017. "Enniatin B and Beauvericin Are Common in Danish Cereals and Show High Hepatotoxicity on a High-Content Imaging Platform." *Environmental Toxicology* 32(5):1658–64. doi: 10.1002/tox.22367.
Tabuc, Cristina. 2007. "Flore Fongique de Différents Substrats et Conditions Optimales de Production Des Mycotoxines."
Taheur, Fadia Ben, Kais Fedhila, Kamel Chaieb, Bochra Kouidhi, Amina Bakhrouf, and Luís Abrunhosa. 2017. "Adsorption of Aflatoxin B1, Zearalenone and Ochratoxin A by Microorganisms Isolated from Kefir Grains." *International Journal of Food Microbiology* 251:1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.021.
Ben Taheur, Fadia, Bochra Kouidhi, Yasir Mohammed A. Al Qurashi, Jalila Ben Salah-Abbès, and Kamel Chaieb. 2019. "Review: Biotechnology of Mycotoxins Detoxification Using Microorganisms and Enzymes." *Toxicon* 160:12–22.
Takemura, Hitomi, Joong Youn Shim, Kazutoshi Sayama, Airo Tsubura, Bao Ting Zhu, and Kayoko Shimoi. 2007. "Characterization of the Estrogenic Activities of Zearalenone and Zeranol in Vivo and in Vitro." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103(2):170–77. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.08.008.
Tamminen, Marja, Tiina Joutsjoki, Marietta Sjöblom, Marja Joutsen, Airi Palva, E-L Ryhänen, and Vesa Joutsjoki. 2004. "Screening of Lactic Acid Bacteria from Fermented Vegetables by Carbohydrate Profiling and PCR–ELISA." *Letters in Applied Microbiology* 39(5):439–44.
Tan, Diana C., Gavin R. Flematti, Emilio L. Ghisalberti, Krishnapillai Sivasithamparam, Sukumar Chakraborty, Friday Obanor, and Martin John Barbetti. 2011. "Mycotoxins Produced by Fusarium Species Associated with Annual Legume Pastures and 'sheep Feed Refusal Disorders' in Western Australia." *Mycotoxin Research* 27:123–35. doi: 10.1007/s12550-010-0085-0.
Tantaoui-Elaraki, A., A. Riba, S. Oueslati, and A. Zinedine. 2018. "Toxigenic Fungi and Mycotoxin Occurrence and Prevention in Food and Feed in Northern Africa – A Review." *World Mycotoxin Journal* 385–400.
Tatay, Elena, Silvia Espín, Antonio Juan García-Fernández, and María José Ruiz. 2018. "Estrogenic Activity of Zearalenone, α-Zearalenol and β-Zearalenol Assessed Using the E-Screen Assay in MCF-7 Cells." *Toxicology Mechanisms and Methods* 28(4):239–42. doi: 10.1080/15376516.2017.1395501.
Tessari, E. N. C., C. A. F. Oliveira, ALSP Cardoso, D. R. Ledoux, and G. E. Rottinghaus. 2006. "Effects of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 on Body Weight, Antibody Titres and Histology of Broiler Chicks." *British Poultry Science* 47(3):357–64.
Thornberry, Nancy A., Herbert G. Bull, Jimmy R. Calaycay, Kevin T. Chapman, Andrew D. Howard, Matthew J. Kostura, Douglas K. Miller, Susan M. Molineaux, Jeffrey R. Weidner, John Aunins, Keith O. Elliston, Julia M. Ayala, Francesca J. Casano, Jayne Chin, Gloria J. F. Ding, Linda A. Egger, Erin P. Gaffney, Guadalupe Limjuco, Oksana

C. Palyha, S. M. Raju, Anna M. Rolando, J. Paul Salley, Ting Ting Yamin, Terry D. Lee, John E. Shively, Malcolm MacCross, Richard A. Mumford, John A. Schmidt, and Michael J. Tocci. 1992. "A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1βprocessing in Monocytes." *Nature* 356(6372):768–74. doi: 10.1038/356768a0.

Tinyiro, Samuel Edgar, Cuthbert Wokadala, Dan Xu, and Weirong Yao. 2011. "Adsorption and Degradation of Zearalenone by Bacillus Strains." *Folia Microbiologica* 56(4):321–27. doi: 10.1007/s12223-011-0047-8.

Turcotte, Joanne C., Peter J. B. Hunt, and Jeffrey D. Blaustein. 2005. "Estrogenic Effects of Zearalenone on the Expression of Progestin Receptors and Sexual Behavior in Female Rats." *Hormones and Behavior* 47(2):178–84. doi: 10.1016/j.yhbeh.2004.09.005.

Turnbaugh, Peter J., Micah Hamady, Tanya Yatsunenko, Brandi L. Cantarel, Alexis Duncan, Ruth E. Ley, Mitchell L. Sogin, William J. Jones, Bruce A. Roe, and Jason P. Affourtit. 2009. "A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins." *Nature* 457(7228):480.

Turnbaugh, Peter J., Ruth E. Ley, Micah Hamady, Claire M. Fraser-Liggett, Rob Knight, and Jeffrey I. Gordon. 2007. "The Human Microbiome Project." *Nature* 449(7164):804.

Udovicki, Bozidar, Nikola Tomic, Bojana Spirovic Trifunovic, Sasa Despotovic, Jelena Jovanovic, Liesbeth Jacxsens, and Andreja Rajkovic. 2021. "Risk Assessment of Dietary Exposure to Aflatoxin B1 in Serbia." *Food and Chemical Toxicology* 151:112116. doi: 10.1016/j.fct.2021.112116.

Uhlig, Silvio, Mona Torp, and Berit T. Heier. 2006. "Beauvericin and Enniatins A, A1, B and B1 in Norwegian Grain: A Survey." *Food Chemistry* 94(2):193–201. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.004.

Unicef. 2008. "OMS: 2008." *Progress on Drinking Water and Sanitation: Special Focus on Sanitation. Programa Conjunto de Seguimiento de UNICEF y Organización Mundial de La Salud Para El Abastecimiento de Agua y El Saneamiento, UNICEF: Nueva York y OMS: Ginebra*.

Vejdovszky, Katharina, Kathrin Hahn, Dominik Braun, Benedikt Warth, and Doris Marko. 2017. "Synergistic Estrogenic Effects of Fusarium and Alternaria Mycotoxins in Vitro." *Archives of Toxicology* 91(3):1447–60. doi: 10.1007/s00204-016-1795-7.

Vekiru, E., S. Fruhauf, M. Sahin, F. Ottner, G. Schatzmayr, and R. Krska. 2007. "Investigation of Various Adsorbents for Their Ability to Bind Aflatoxin B1." *Mycotoxin Research* 23(1):27–33. doi: 10.1007/BF02946021.

Ven, H. H. Van Der, B. G. Crabo, and L. J. D. Zaneveld. 1984. "Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and Its Relationship to Other Semen Characteristics." *Journal of Reproduction and Fertility* 70(1):219–28. doi: 10.1530/jrf.0.0700219.

Vidal, Arnau, Salma Ouhibi, Ridha Ghali, Abderrazek Hedhili, Sarah De Saeger, and Marthe De Boevre. 2019. "The Mycotoxin Patulin: An Updated Short Review on Occurrence, Toxicity and Analytical Challenges." *Food and Chemical Toxicology* 249–56.

Vipin, A. V, Raksha Rao K, Nawneet Kumar, Anu Appaiah K. A, and G. Venkateswaran. 2017. "ScienceDirect Protective Effects of Phenolics Rich Extract of Ginger against A Fl Atoxin B 1 -Induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity." *Biomedicine et Pharmacotherapy* 91:415–24. doi: 10.1016/j.biopha.2017.04.107.

Volman, Julia J., Julian D. Ramakers, and Jogchum Plat. 2008. "Dietary Modulation of Immune Function by β -Glucans." 94:276–84. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.045.

Wagacha, J. M., and J. W. Muthomi. 2008. "Mycotoxin Problem in Africa: Current Status, Implications to Food Safety and Health and Possible Management Strategies." *International Journal of Food Microbiology* 1–12.

Walter, Jens, and Ruth Ley. 2011. "The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent

Evolutionary Changes." *Annual Review of Microbiology* 65:411–29.
Wang, Shuai, Qiangyi Wang, Ence Yang, Ling Yan, Tong Li, and Hui Zhuang. 2017. "Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal Lactobacillus Crispatus Are Able to Strongly Inhibit Candida Albicans Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-Related Gene Expressions." *Frontiers in Microbiology* 8:564.
Wätjen, Wim, Abdessamad Debbab, Anke Hohlfeld, Yvonni Chovolou, Andreas Kampkötter, Ru Angelie Edrada, Rainer Ebel, Abdelhak Hakiki, Mahjouba Mosaddak, Frank Totzke, Michael H. G. Kubbutat, and Peter Proksch. 2009. "Enniatins A1, B and B1 from an Endophytic Strain of Fusarium Tricinctum Induce Apoptotic Cell Death in H4IIE Hepatoma Cells Accompanied by Inhibition of ERK Phosphorylation." *Molecular Nutrition and Food Research* 53:431–40. doi: 10.1002/mnfr.200700428.
Whitman, William B., David C. Coleman, and William J. Wiebe. 1998. "Perspective Prokaryotes : The Unseen Majority." 95(June):6578–83.
Wiles, Melinda C., Henry J. Huebner, Evans Afriyie-Gyawu, Robert J. Taylor, Gerald R. Bratton, and Timothy D. Phillips. 2004. "Toxicological Evaluation and Metal Bioavailability in Pregnant Rats Following Exposure to Clay Minerals in the Diet." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 67(11):863–74. doi: 10.1080/15287390490425777.
Williams, J. G., U. Deschl, and G. M. Williams. 2011. "DNA Damage in Fetal Liver Cells of Turkey and Chicken Eggs Dosed with Aflatoxin B 1." *Archives of Toxicology* 85(9):1167–72.
Williams, Lynda B., and Shelley E. Haydel. 2010. "Evaluation of the Medicinal Use of Clay Minerals as Antibacterial Agents." *International Geology Review* 52(7–8):745–70.
Willing, B. P., and A. G. Van Kessel. 2007. "Enterocyte Proliferation and Apoptosis in the Caudal Small Intestine Is Influenced by the Composition of Colonizing Commensal Bacteria in the Neonatal Gnotobiotic Pig." *Journal of Animal Science* 85(12):3256–66.
Willing, B. P., and A. G. Van Kessel. 2009. "Intestinal Microbiota Differentially Affect Brush Border Enzyme Activity and Gene Expression in the Neonatal Gnotobiotic Pig." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93(5):586–95.
Wong, Z. A., and D. P. Hsieh. 1978. "Aflatoxicol: Major Aflatoxin B1 Metabolite in Rat Plasma." *Science* 200(4339):325–27.
Wu, F. 2006. "Economic Impact of Fumonisin and Aflatoxin Regulations on Global Corn and Peanut Markets." Pp. 83–93 in *The Mycotoxin Factbook: Food & Feed Topics*.
Wu, Qifang, Lijuan Xie, and Huirong Xu. 2018. "Determination of Toxigenic Fungi and Aflatoxins in Nuts and Dried Fruits Using Imaging and Spectroscopic Techniques." *Food Chemistry* 252(January):228–42. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.076.
Wu, Qinghua, Alena Jezkova, Zonghui Yuan, Lucie Pavlikova, Vlastimil Dohnal, and Kamil Kuca. 2009. "Biological Degradation of Aflatoxins." *Drug Metabolism Reviews*.
Yagi, Kunio. 1976. "A Simple Fluorometric Assay for Lipoperoxide in Blood Plasma." *Biochem. Med.* 15:212–16.
Yang, Kai, Ke Li, Lihong Pan, Xiaohu Luo, Jiali Xing, Jing Wang, Li Wang, Ren Wang, Yuheng Zhai, and Zhengxing Chen. 2020. "Effect of Ozone and Electron Beam Irradiation on Degradation of Zearalenone and Ochratoxin A." *Toxins* 12(2). doi: 10.3390/toxins12020138.
Yang, Rong, Yi Mei Wang, Li Zhang, Zeng Ming Zhao, Jun Zhao, and Shuang Qing Peng. 2016. "Prepubertal Exposure to an Oestrogenic Mycotoxin Zearalenone Induces Central Precocious Puberty in Immature Female Rats through the Mechanism of Premature Activation of Hypothalamic Kisspeptin-GPR54 Signaling." *Molecular and Cellular Endocrinology* 437:62–74. doi: 10.1016/j.mce.2016.08.012.
Yang, Shupeng, Huiyan Zhang, Sarah de Saeger, Marthe de Boevre, Feifei Sun, Suxia Zhang,

Xingyuan Cao, and Zhanhui Wang. 2015. “In Vitro and in Vivo Metabolism of Ochratoxin A: A Comparative Study Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Time-of-Flight Hybrid Mass Spectrometry.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(13):3579–89. doi: 10.1007/s00216-015-8570-0.

Yiannikouris, A., and J. Franc. 2004. “Adsorption of Zearalenone by b - D -Glucans in the Saccharomyces Cerevisiae Cell Wall.” 67(6):1195–1200.

Yousef, Mohamed S., Mitsuhiro Takagi, Anup K. Talukder, Mohamed A. Marey, Rasoul Kowsar, Abdel Razek Kh Abdel-Razek, Takashi Shimizu, Johanna Fink-Gremmels, and Akio Miyamoto. 2017. “Zearalenone (ZEN) Disrupts the Anti-Inflammatory Response of Bovine Oviductal Epithelial Cells to Sperm in Vitro.” *Reproductive Toxicology* 74:158–63. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.09.012.

Yuan, Shyng-Shiou F., Kun-Bow Tsai, Yueh-Fang Chung, Te-Fu Chan, Yao-Tsung Yeh, Li-Yu Tsai, and Jinu-Huang Su. 2004. “Aberrant Expression and Possible Involvement of the Leptin Receptor in Endometrial Cancer.” *Gynecologic Oncology* 92(3):769–75.

Zaied, Chiraz, Salwa Abid, Wafa Hlel, and Hassan Bacha. 2013. “Occurrence of Patulin in Apple-Based-Foods Largely Consumed in Tunisia.” *Food Control* 31(2):263–67. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.10.005.

Zaied, Chiraz, Nidhal Zouaoui, Hassan Bacha, and Salwa Abid. 2012a. “Natural Occurrence of Citrinin in Tunisian Wheat Grains.” *Food Control* 28(1):106–9. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.04.015.

Zaied, Chiraz, Nidhal Zouaoui, Hassan Bacha, and Salwa Abid. 2012b. “Natural Occurrence of Zearalenone in Tunisian Wheat Grains.” *Food Control* 25(2):773–77. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.012.

Zebiri, Saliha, Salim Mokrane, Carol Verheecke-Vaessen, Elodie Choque, Hocine Reghioui, Nasserdine Sabaou, Florence Mathieu, and Amar Riba. 2019. “Occurrence of Ochratoxin A in Algerian Wheat and Its Milling Derivatives.” *Toxin Reviews* 1–6. doi: 10.1080/15569543.2018.1438472.

Zepnik, Herbert, Wolfgang Völkel, and Wolfgang Dekant. 2003. “Toxicokinetics of the Mycotoxin Ochratoxin A in F 344 Rats after Oral Administration.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 192(1):36–44. doi: 10.1016/S0041-008X(03)00261-8.

Zhang, Guo Liang, Xiao Feng Sun, Yan Zhong Feng, Bo Li, Ya Peng Li, Fan Yang, Charles Martin Nyachoti, Wei Shen, Shi Duo Sun, and Lan Li. 2017. “Zearalenone Exposure Impairs Ovarian Primordial Follicle Formation via Down-Regulation of Lhx8 Expression in Vitro.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 317:33–40. doi: 10.1016/j.taap.2017.01.004.

Zhang, Rui Qian, Xiao Feng Sun, Rui Ying Wu, Shun Feng Cheng, Guo Liang Zhang, Qiu Yue Zhai, Xue Lian Liu, Yong Zhao, Wei Shen, and Lan Li. 2018. “Zearalenone Exposure Elevated the Expression of Tumorigenesis Genes in Mouse Ovarian Granulosa Cells.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 356:191–203. doi: 10.1016/j.taap.2018.08.013.

Zhao, Hongfei, Xiao Wang, Junwen Zhang, Jun Zhang, and Bolin Zhang. 2016. “The Mechanism of Lactobacillus Strains for Their Ability to Remove Fumonisins B1 and B2.” *Food and Chemical Toxicology* 97:40–46. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.028.

Zinedine, A., C. Juan, J. M. Soriano, J. C. Moltó, L. Idrissi, and J. Mañes. 2007. “Limited Survey for the Occurrence of Aflatoxins in Cereals and Poultry Feeds from Rabat, Morocco.” *International Journal of Food Microbiology* 115(1):124–27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.013.

Zinedine, Abdellah, Mónica Fernández-Franzón, Jordi Mañes, and Lara Manyes. 2017. “Multi-Mycotoxin Contamination of Couscous Semolina Commercialized in Morocco.” *Food Chemistry* 217:440–46. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.098.

Zinedine, Abdellah, Giuseppe Meca, Jordi Mañes, and Guillermina Font. 2011. "Further Data on the Occurrence of Fusarium Emerging Mycotoxins Enniatins (A, A1, B, B1), Fusaproliferin and Beauvericin in Raw Cereals Commercialized in Morocco." *Food Control* 22:1–5. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.05.002.

Zinedine, Abdellah, Jose Miguel Soriano, Juan Carlos Moltó, and Jordi Mañes. 2007a. "Review on the Toxicity, Occurrence, Metabolism, Detoxification, Regulations and Intake of Zearalenone: An Oestrogenic Mycotoxin." *Food and Chemical Toxicology*.

Zinedine, Abdellah, Jose Miguel Soriano, Juan Carlos Moltó, and Jordi Mañes. 2007b. "Review on the Toxicity, Occurrence, Metabolism, Detoxification, Regulations and Intake of Zearalenone: An Oestrogenic Mycotoxin." *Food and Chemical Toxicology* 45:1–18.

Złoch, Michał, Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, Viorica Railean-Plugaru, Justyna Walczak-Skierska, Joanna Rudnicka, and Bogusław Buszewski. 2020. "Use of Lactobacillus Paracasei Strain for Zearalenone Binding and Metabolization." *Toxicon* 181:9–18. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.03.011.

Zoetendal, Erwin G., Antoon D. L. Akkermans, Wilma M. Akkermans-van Vliet, J. Arjan G. M. de Visser, and Willem M. de Vos. 2001. "The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastronintestinal Tract." *Microbial Ecology in Health and Disease* 13(3):129–34.

Zouaoui, Nidhal, Naira Sbaii, Hassen Bacha, and Salwa Abid-Essefi. 2015. "Occurrence of Patulin in Various Fruit Juice Marketed in Tunisia." *Food Control* 51:356–60. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.048.

Résumé

Les mycotoxines sont des composés naturellement toxiques. Elles sont considérées comme une préoccupation internationale en matière de sécurité sanitaire. Les céréales sont les denrées alimentaires les plus fréquemment contaminées par les mycotoxines. Ces dernières, constituent un problème d'ordre mondial qui affecte la sécurité sanitaire et la qualité des céréales. En Tunisie, le blé est la céréale la plus cultivée, il constitue, avec ses dérivés, l'épine dorsale du système alimentaire tunisien. La Tunisie est un pays chaud et humide, elle offre des conditions favorables à la croissance et la multiplication des champignons toxinogènes. Le but de la présente étude est d'étudier l'occurrence des mycotoxines dans la filière blé en Tunisie par une analyse multi-mycotoxines en utilisant UHPLC-MS/MS. 136 échantillons de blé sont collectés de deux régions climatiques différentes : Kairouan (zone continentale sèche) et Béja (zone littorale humide). La collecte est effectuée en différents points de la filière : au champ, à la récolte, au pré-stockage et au stockage durant deux compagnes successives en 2020 et en 2021 dont le but est de déterminer le risque sur la population tunisienne. Ensuite, nous avons essayé d'évaluer le pouvoir de décontamination des ces mycotoxines in *vitro* par l'utilisation des bactéries lactiques (LAB) et de la Bentonite (BT) et d'étudier la toxicité de ces mycotoxines et la capacité de ces bio-produits à prévenir leur toxicité in vivo.

L'analyse multi-mycotoxines des échantillons de blé montre bien que la filière blé en Tunisie est contaminé par l'aflatoxine B1 (AFB1) et/ou des enniatines A1, B, B1. L'AFB1 a contaminé plus fréquemment les échantillons de blé stocké et toutes les concentrations déterminées dépassent la limite des doses acceptables (2 µg/kg). Toutefois, les enniatines A1 et B ont été détectées aux différents points de collecte du blé et dans les 2 régions d'échantillonnage (continentale et littorale). Au cours des deux années d'échantillonnage, l'enniatine B était la mycotoxine la plus fréquemment trouvée, suivie par l'enniatine B1 et l'enniatine A1. Tous les échantillons prélevés avaient une activité hydrique inférieure à 0,7 et la teneur en eau variait de 9 à 14 %, ce qui indique que la présence de mycotoxines dans les échantillons de blé était le résultat d'une contamination antérieure par des facteurs favorisant l'infection fongique et la production de mycotoxines (conditions climatiques, pratiques culturales des agriculteurs et conditions de stockage). Les concentrations d'AFB1 et la co-occurrence de mycotoxines dans les échantillons de blé dur rapportés dans cette étude représentent un risque pour la santé des consommateurs tunisiens.

Pour l'étude in *vitro*, Les résultats ont révélé que les 3 *Lactobacillus* utilisées, *L. plantarum* MON03 (LP), *L. paracasei* BEJ01 (LB), *L. rhamnosus* GAF06 (LR) et la BT, ont montré une capacité pour éliminer les mycotoxines (AFB1, AFM1, OTA et ZEN) dans les différentes conditions testées. Ensuite, selon la CI_{50}, les données ne reflétaient pas la toxicité du BT ou du LP sur des cellules Vero, cellules Caco-2, C5-O, HepG2 et leucocytes humains. La LP et/ou la BT ont protégé les cellules Caco-2 par inhibition de la fragmentation d'ADN et la réduction de l'activité enzymatique de la caspase-3 dans les cellules Caco-2 traitées à la ZEN et à l'AFB1. La combinaison de BT et de LP a atténué fortement l'effet toxique de l'AFB1 et de ZEN par rapport à l'utilisation de la BT ou de la LP seule. L'étude in *vivo* a confirmé la toxicité de l'AFM1 qui est un métabolite de l'AFB1 sur les déférents paramètres biologiques testés. Au niveau du foie et des reins, le déclenchement du stress oxydatif ainsi que les altérations histologiques font des preuves de l'hépatotoxicité et de la néphrotoxicité de l'AFM1 chez les souris. Cette toxine a montré de plus un effet immunotoxique par la diminution de la viabilité des splénocytes et des thymocytes ainsi que des modifications de la réponse immunitaire cellulaire et humorale chez la souris. Il en ressort également que la fonction reproductrice a été touchée par l'AFB1 et la ZEN qui se sont avérée capable d'altérer la spermatogenèse. Le co-traitement par les différentes mycotoxines et la BT et/ou la LAB a pu réduire les effets toxiques enregistré chez la souris.

En guise de conclusion, la LAB et/ou la BT peut être considéré comme deux candidats dans la biotechnologie de détoxification des aliments contaminés par les mycotoxines dans les fermes d'élevage bovin et l'industrie agro-alimentaire.

Mots clés : Mycotoxines; Blé; Tunisie; Décontamination; Lactic acid bacteria; bentonite.

Abstract

Mycotoxins are naturally toxic compounds. They are considered an international health security concern. Cereals are the foodstuffs most frequently contaminated by mycotoxins. The latter constitute a global problem which affects the health safety and quality of cereals. In Tunisia, wheat is the most cultivated cereal; it constitutes, with its derivatives, the backbone of the Tunisian food system. Tunisia is a hot and humid country; it offers favorable conditions for the growth and multiplication of toxigenic fungi. The aim of our studies is to study the occurrence of mycotoxins in the wheat sector in Tunisia by a multi-mycotoxin analysis using UHPLC-MS/MS. 136 wheat samples are collected from two different climatic regions: Kairouan (dry continental zone) and Béja (humid coastal zone). Collection is carried out at different points in the sector: in the field, at harvest, at pre-storage and storage during two successive campaigns in 2020 and 2021, the aim of which is to determine the risk for the Tunisian population. Then, we tried to evaluate the decontamination power of these mycotoxins in vitro by the use of lactic acid bacteria and Bentonite and to study the toxicity of these mycotoxins and the capacity of these bio- products to prevent their toxicity in vivo.

The multi-mycotoxin analysis of wheat samples clearly shows that the wheat sector in Tunisia is contaminated by aflatoxin B1 (AFB1) and/or enniatins A1, B, B1. AFB1 contaminated stored wheat samples more frequently and all concentrations determined exceed the acceptable dose limit (2 µg/kg). However, enniatins A1 and B were detected at the different wheat collection points and in the 2 sampling regions (continental and coastal). During both years of sampling, enniatin B was the most frequently found mycotoxin, followed by enniatin B1 and enniatin A1. All samples collected had a water activity less than 0.7 and the moisture content ranged from 9 to 14%, indicating that the presence of mycotoxins in the wheat samples was the result of previous contamination by factors promoting fungal infection and mycotoxin production (climatic conditions, farmers' cultivation practices and storage conditions). The concentrations of AFB1 and the co-occurrence of mycotoxins in durum wheat samples reported in this study represent a health risk for Tunisian consumers. For the in vitro study, the results revealed that the 3 Lactobacillus used, L. plantarum MON03 (LP), L. paracasei BEJ01 (LB), L. rhamnosus GAF06 (LR) and BT, showed an ability to eliminate mycotoxins (AFB1, AFM1, OTA and ZEN) in the different conditions tested. Then, according to IC50, the data did not reflect the toxicity of BT or LP on Vero cells, Caco-2 cells, C5-O cells, HepG2 and human leukocytes. LP and/or BT protected Caco-2 cells by inhibition of DNA fragmentation and reduction of caspase-3 enzymatic activity in ZEN- and AFB1-treated Caco-2 cells. The combination of BT and LP strongly attenuated the toxic effect of AFB1 and ZEN compared to the use of BT or LP alone.

The in vivo study confirmed the toxicity of AFM1 which is a metabolite of AFB1 on the various biological parameters tested. In the liver and kidneys, the triggering of oxidative stress as well as histological alterations provide evidence of the hepatotoxicity and nephrotoxicity of AFM1 in mice. This toxin also showed an immunotoxic effect by reducing the viability of splenocytes and thymocytes as well as modifications in the cellular and humoral immune response in mice. It also emerged that reproductive function was affected by AFB1 and ZEN which were found to be capable of altering spermatogenesis. Co-treatment with different mycotoxins and BT and/or LAB was able to reduce the toxic effects recorded in mice.

As a conclusion, LAB and/or BT can be considered as two candidates in the biotechnology of detoxification of foods contaminated by mycotoxins in cattle farms and the agro-food industry.

Keywords: Mycotoxin; wheat; Tunisia; decontamination; Bentonite; lactic acid bacteria