



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida



Université Saad
Dahlab-Blida 1-

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Effet des mycotoxines dans l'aliment sur la santé des
ovins**

Présenté par

ADDAR SARAH ET MEGLALI KAHINA

Devant le jury :

Président(e) :	DAHMANI HICHEM	MCB	Université Blida
Examineur :	DAHMANI ALI	MCB	Université Blida
Promoteur :	METREF AHMED KHIREDINE	MCB	Université Blida

Année : 2019- 2020

Remerciement

Avant de commencer la présentation de ce modeste travail, nous profitons l'occasion pour remercier du fond du cœur toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à Mr .A.METREF Maître de conférence B à la faculté médecine vétérinaire Blida pour son encadrement, sa généreuse disponibilité, sa grande professionnalité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous désirons aussi remercier Docteur BIBIMOUNE responsable de laboratoire vétérinaire et contrôle qualité des produits agroalimentaire, cosmétique et eaux de nous avoir donné l'occasion extraordinaire de réaliser notre stage aussi pour sa gentillesse, ses conseils et ses encouragements.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

- A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir : mon cher père Ali.
- A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui na jamais dit non a mes exigences et qui na épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère Malika.
- A mes chères sœurs Fazia et Zahia qui n'ont pas cessée de me conseiller encourager et soutenir tout au long de mes études .que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.
- A mes chers petits neveux : Adem, Zaki, Yousef et Ilyane.
- A ma grand mère chérie qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur.
- A mes amies, qui d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé à prendre mes études en main jusqu'à l'obtention du diplôme docteur vétérinaire.
- Sans oublier mon binôme Sarah pour son soutien moral sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Kahina

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un amour profond à mes chers parents

- ADDAR Slimane
- SAHELI Fariza

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien inconditionnel et leurs prières tout au long de mes études.

- A ma sœur Yasmine et mon frère Yanis.
- A toute les personnes de ma grande famille.
- A mes meilleures amies de tous les jours.
- A ma chère binôme Kahina et sa famille.

Merci d'être toujours là pour moi

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.

Sarah

Liste de tableau :

Tableau 1: Voies majeures de bioconversion des mycotoxines dans les systèmes biologique	12
Tableau 2 : effet des principales mycotoxine sur la santé des ovins	18
Tableau 3 : effet des autres mycotoxines sur la sante des ovins	19
Tableau 4 : quelques mesures de prévention et maitrise des mycotoxicoses	36
Tableau 5 : efficacité comparée des méthodes chimiques De décontamination	43
Tableau 6 : efficacité comparée des méthodes physique de décontamination	45
Tableau 7 : les ligands inorganique pour la lutte contre les mycotoxines	47
Tableau 8 : microorganisme connus comme dégradant les fumonisines et activités impliquées	49
Tableau 9 : renseignement concernant les élevages	55
Tableau 10 : description des résultats macroscopique des analyses mycologique des aliments	61
Tableau 11 : description des résultats microscopique des analyses mycologique des aliments	67
Tableau 12 : données obtenues après comptage des colonies pour chaque boite après 3 j d'incubation	68
Tableau 13 : Echelle de La pathogénicité des champignons	69

Liste de figures :

Figure 1 : Cas mondiaux d'aliments contaminés par des mycotoxines et analysés par le laboratoire	20
Figure 2 : seuils de tolérance recommandés de mycotoxines retrouvées dans les aliments de bétails	20
Figure 3 : mise en culture et identification des champignons	25
Figure 4 : Diagramme de conservation des céréales	37
Figure 5 : l'aération des grains et la variation des zones d humidité en fonction des saisons	41
Figure 6 : étapes clés pour la prévention contre les mycotoxines	42
Figure 7 : les différents échantillons d'aliment prélevé au niveau des élevages	54
Figure 8 : préparation de la suspension	56
Figure 9 : la suspension finale	57
Figures 10.11.12 : les différentes étapes d'ensemencement	58
Figure 13 : incubation des boites dans une étuve a 36	59
Figure 14 : aspect microscopique (d x40) d'aspergillus après 6 jours de culture sur milieu Sabouraud d'un échantillon de son de blé tendre (boite1).	62
Figure 15 : aspect microscopique d'aspergillus (d x40) après 6 jours de culture d'un échantillon de maïs /pain racis (boite 7).	63
Figure 16 : aspect microscopique de trichoderma (d x40) après 6 jours de culture d'un échantillon de maïs (boite2).	63
Figure 17 : aspect microscopique (d x40) de mucor après 6 jours de culture sabouraud d'un échantillon de son blé tendre (boite1).	64
Figure 18 : aspect microscopique (d x40) de geotrichum après 6 jours de culture d'un échantillon d'orge (boite3).	64
Figure 19 : aspect microscopique (d x40) de rhizopus après 6 jours de culture d'un échantillon pain racis / maïs (boite7).	65
Figure 20 : fréquence d'isolement des genres de champignons isolés de ensemble des échantillons d'aliment analysées	68
Figure 21 : densité relative des genres de champignons isolés de l'ensemble des échantillons d'aliments analysés	69

Liste des sigles et des abréviations

AW: Activity of water

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

DON : Déoxynivalénol

DAS : Diacétoxyscirpénol

NIV : Nivalénol

PAT : Patuline

OTA : Ochratoxine A

P : Penicillium

MAS : monoacétoscirpénol

ZEN : Zéaralénone

AFB1 : Aflatoxine B1

AFM1 : Aflatoxine M1

AFP1 : Aflatoxine P1

DOM-1 : dé-époxy DON

P450 : Les cytochromes P450

ELISA : Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay

PCR : Polymérase Chain Réaction

UV : Le rayonnement ultra-violet

AG : Un antigène

AC : Les anticorps

CCM : La chromatographie sur couche mince

AESA : L'Autorité européenne de sécurité des aliments

HPLC : High performance liquid chromatography, Chromatographie liquide haute performance

T-2 : Toxine T-2

HT-2 : Toxine HT-2

MIP-2 : macrophage inflammatory protein

GCMS : Gas chromatography-mass spectrometry

MS : Spectrométrie de masse

AND : acide désoxyribonucléique

CO₂ : gaz carbonique

O₂ : Le dioxygène

H₂O : monoxyde de dihydrogène

HSCAS: Hydrated sodium calcium aluminosilicate

FB1: Fumonisines B1

Fr : la fréquence

Dr : densité relative

Résumé

La contamination des aliments des ovins par des mycotoxines est très courante. Elles sont produites sur une large variété de denrées alimentaires avant, pendant et après récolte. En raison de la diversité de leurs effets toxiques et de leurs propriétés synergiques, les mycotoxines présentent un risque pour les ruminants. Le métabolisme des mycotoxines est complexe et comprend plusieurs voies de bioactivation et de détoxification régies par des mécanismes de biotransformation résultant de l'action d'enzymes de l'hôte et de la flore microbienne présente dans le tube digestif. Une partie des toxines ou de leurs métabolites peut se fixer dans les tissus biologiques ; la majorité est éliminée par voie urinaire, fécale et lactée. La toxicité se manifeste généralement par des troubles chroniques légers et n'aboutit que rarement à la mort. Une diminution de l'ingestion et des performances zootechniques est généralement observée. Le problème de la présence éventuelle de résidus toxiques se pose pour les produits animaux destinés à la consommation humaine (lait, viande, abats). La réduction des risques passe par un contrôle de la contamination fongique des végétaux résultant de la maîtrise des méthodes de culture, de récolte et de conservation, par des techniques d'élimination des toxines sur l'aliment contaminé, et par une réduction de leur biodisponibilité dans le tractus digestif des animaux par l'emploi d'adsorbants.

Mots clés : aliments, mycotoxine, ovin, toxicité.

Summary

Contamination of ovins' food with mycotoxins is very common. They are produced on a wide variety of foodstuffs before, during and after harvest. Due to the diversity of their toxic effects and their synergistic properties, mycotoxins pose a risk to ruminants. The metabolism of mycotoxins is complex and includes several bioactivation and detoxification pathways controlled by biotransformation mechanisms resulting from the action of host enzymes and microbial flora present in the digestive tract. A part of the toxins or their metabolites can restrain in biological tissues; the majority are eliminated via the urine, feces and milk. Toxicity is usually manifested by soft chronic troubles and rarely results in death. A decrease in intake and zootechnical performance is generally observed. The problem of the possible presence of toxic residues arises for animal products intended for human consumption (milk, meat, organ meats). Risk reduction involves controlling fungal contamination of plants resulting from the control of cultivation, harvesting and conservation methods, by techniques for removing toxins from the contaminated food, and by reducing their bioavailability in the digestive tract of animals by the use of adsorbents.

Keys words: food, mycotoxins , ovins ,toxicity.

المخلص

تلوث علف الأغنام بالسموم الفطرية شائع جداً. يتم إنتاجها على مجموعة متنوعة من المواد الغذائية قبل الحصاد أثناءه وبعده. بسبب تنوع آثارها السامة وخصائصها التأخرية ، تشكل السموم الفطرية خطراً على المجترات. عملية التمثيل الغذائي للسموم الفطرية معقدة وتتضمن العديد من مسارات التنشيط الحيوي وإزالة السموم التي تحكمها آليات التحول الأحيائي الناتجة عن عمل الإنزيمات المضيفة والبكتيريا النافعة الموجودة في الجهاز الهضمي. يمكن أن يرتبط جزء من السموم أو نواتج أيضها في الأنسجة البيولوجية ؛ يتم التخلص من الغالبية عن طريق البول والبراز والحليب. تتجلى السمية عمومًا في الاضطرابات المزمنة الخفيفة ونادرًا ما تؤدي إلى الوفاة. بشكل عام لوحظ انخفاض في المدخول وأداء علم الحيوان. تنشأ مشكلة الوجود المحتمل للمخلفات السامة للمنتجات الحيوانية المعدة للاستهلاك الأدمي (الحليب واللحوم). ينطوي الحد من المخاطر على التحكم في التلوث الفطري للنباتات الناتج عن التحكم في أساليب الزراعة والحصاد والحفظ ، وتقنيات إزالة السموم من الأغذية الملوثة ، وتقليل التوافر الحيوي لها في الجهاز الهضمي للحيوانات باستخدام الممتزات التي تعمل على تثبيت التوكسينات وتحويلها إلى أملاح ومواد غير قابلة الذوبان في الجهاز الهضمي .

كلمات المفتاح: الأغنام, السامة, السموم الفطرية, العلف.

Table de matière:

Partie 01: revue bibliographique

Introduction	1
Chapitre 01 : Les principales mycotoxines chez les ovins	3
1.1 Les moisissures	3
1.2 définition des mycotoxines.....	4
1.3 Les principales mycotoxines	5
1.3.1 Aflatoxine	5
1.3.2 Trichothécènes	5
1.3.3 Zéaralénone	6
1.3.4 Ochratoxine A (OTA)	6
1.3.5 Fumonisines	7
1.3.6 Patuline	7
1.3.7 Alcaloïdes de l'ergot	7
Chapitre 02 : Devenir et bioconversion des mycotoxines	
Dans l'organisme	10
2.1 Dans le rumen.....	10
2.2 Dans l'épithélium intestinal foie et les reins	11
Chapitre 03: aspect clinique de la maladie	14
3.1 Principaux effets non spécifique des mycotoxines	14
Diminution de la consommation alimentaire	14
a. Effets sur le système endocrinien et les glandes exocrines	15
b. Immunosuppression.....	15
3.2 Signes cliniques attribuables aux différentes mycotoxines en en élevage ovins.....	15
a. Aflatoxines.....	15
b. Ochratoxine.....	16
c. Trichothécènes.....	16
d. Fumonisines.....	16
e. Patuline.....	17

f. Alcaloïdes de l'ergot	17
3.3le seuil de toxicité.....	19
Chapitre 04 : présence de mycotoxine dans l aliment	2
4. Présence de mycotoxines dans l'aliment	22
4.1 Conséquences de la présence des mycotoxines dans Les fourrages.....	23
4.2 Impact économique des mycotoxines.....	23
a) Impact sur la sante publique	24
4.3 Diagnostic	24
4.3.1 Les différentes méthodes d'analyses des champignons	24
4.3.1.1Les difficultés du diagnostic fongique	24
4.3.1.2Culture	24
4.3.1.3Technique d'amplification moléculaire	25
a)Détection a large spectre d'ADN d'un agent microbien dans un échantillon clinique	26
4.3.2 Les différentes méthodes d'analyse des mycotoxines.....	27
4.3.2.1 Diagnostic clinique	27
4.3.2.2Diagnostic de laboratoire	28
4.3.2.3Echantillonnage	28
4.3.2.4Les méthodes analytiques de mesure	29
4.3.2.5Les types de méthodes et leurs principes Généraux.....	29
a) Les tests immunologiques.....	30
b) Les tests physico-chimiques.....	31
b.1chromatographique.....	31
b.2L'analyse des mycotoxines dans les aliments.....	32
b.3 L'analyse des mycotoxines dans le liquide biologique	32
Chapitre 5 préventions et traitement	35
5.1 Prévention de la contamination des aliments par les mycotoxines	35
5.1.1Bonne méthodes de stockage	36
5.1.1.1 Anaérobiose.....	37
5.1.1.2 Absence humidité.....	38
5.1.1.3 Absence de terre	38
5.1.1.4Les bâtiments et matériels.....	38
a)Précaution pour les bâtiments.....	39
b) Précaution pour le matériel.....	39
c) Protection de personnel expose.....	39
5.1.1.5 Le nettoyage des grains.....	40
5.1.1.6 la ventilation	42
5.1.1.7 l'alimentation des animaux	42
5.2les traitements limitant les effets des mycotoxines.....	43
5.2.1Les méthodes chimiques	44

a) fongicide.....	44
5.2.2 Les méthodes physiques.....	45
a. Les ligands inorganiques.....	45
5.2.3 Le traitement biologique	47
Partie 02 : démarche expérimentale	53
1. analyse mycologique des aliments de bétail	53
1.1 Prélèvement des échantillons	53
1.2 analyse des échantillons.....	55
1.2.1. Préparation des suspensions dilutions.....	55
1.2.1.1 matériel et méthodes	56
1.2.1.2. Identification de la flore fongique contaminant les aliments de bétails	59
a) observation macroscopique	59
b) observation microscopique.....	63
2. discussion	68
2.1 La fréquence	68
2.2 La densité relative	68
2.3 Pathogénicité des genres rencontrés	69
Conclusion générale	72
Référence bibliographique.....	74

INTRODUCTION

À l'heure actuelle, les maladies d'origine alimentaire causées par des moisissures en particulier les mycotoxines constituent l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. Cependant la présence d'une masse impressionnante d'information sur les mycotoxines demeure encore mal comprise en raison de sa très grande complexité et pourtant elles présentent un réel danger pour la santé animale et humaine. (TAZEROUT, 2016).

La contamination des aliments par des mycotoxines est de plus en plus préoccupante. Elle évolue conjointement au changement des pratiques agricoles et probablement aux changements climatiques. Elle engendre une diminution de l'efficacité du système immunitaire, une sensibilité accrue aux maladies et aux infections ainsi des pertes économique très importante.

Dans ce contexte nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement sur l'impact de la présence des mycotoxines dans l'aliment sur la santé des ovins. En effet ce travail s'articule dans un premier temps sur :

Les principales mycotoxines chez les ovins.

Méthode d'analyse et de diagnostic.

L'effet des mycotoxines sur la santé des ovins.

Et les différentes méthodes de prévention et de lutte.

Dans un second temps nous développerons la partie expérimentale de notre travail qui consiste à isoler et identifier la flore fongique qui contamine les aliments.

Chapitre 1 : Les principales mycotoxines chez les ovins

Chapitre 1: Les principales mycotoxines chez les ovins

1.1 Les moisissures

Depuis l'époque initiale où l'homme a commencé à cultiver les céréales et stocker les aliments, la détérioration par les moisissures est inévitable. L'aliment est progressivement envahi par un fin duvet (le mycélium) blanc, noir, vert, orange, rouge et brun. Ces moisissures acidifient, décolorent, font fermenter et rendent ces produits désagréables voire dangereux (Pitt, 1997). Jusqu'à récemment, les moisissures étaient généralement considérées comme une simple détérioration inesthétique des aliments, à l'exception de *Claviceps purpura* relié à une maladie de l'homme depuis 200 ans. C'est réellement à partir de 1960, qu'on a pris conscience que les moisissures pouvaient produire des toxines significatives. (Chapeland-Leclerc et al, 2005).

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme et l'animal. Ils sont ubiquitaires. Les aliments sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (Cahagnier et al, 1998 ; Doyle et al, 1998 ; Meyer et al., 2004).

Les moisissures sont partout dans la nature. Elles se reproduisent par sporulation. C'est-à-dire l'émission de spores visibles sous forme de poussière grisâtre qui émanent des aliments sur lesquels les moisissures ont poussé.

Les moisissures ne produisent pas nécessairement des mycotoxines. Ainsi, la présence de moisissures sur des aliments ne confirme pas la présence de toxines. Les conditions propices à la production de mycotoxines par les moisissures ne sont pas clairement élucidées. On pense que ces champignons microscopiques produiraient ces substances pour se protéger, alors qu'elles se sentent menacées. Ainsi, les spores de ces champignons microscopiques se retrouvent partout. Si les conditions d'humidité deviennent favorables et qu'il y a

présence de matière organique, les moisissures vont se développer avec possiblement production de mycotoxines. (M. NGUYEN MINH TRI 2007).

1.2 Définition des mycotoxines

Les mycotoxines sont des composés chimique nocives produites par des moisissures (telles que les champignons des genres *Penicillium* *Aspergillus* et *Fusarium*.) retrouvés dans le sol et qui peuvent proliférer sur la matière végétale incluant les aliments comme le fourrage et les grains.

En général, plus d'une mycotoxine vont être trouvées sur un substrat contaminé. Quelques moisissures sont capables de produire plusieurs mycotoxines et quelques mycotoxines sont produites par différentes espèces fongiques (Hussein, 2001). Les facteurs qui affectent la formation de mycotoxines incluent la teneur en eau (activité en eau A_w supérieure à 0,6) , la température (Les moisissures peuvent se développer entre 0°C et 35°C), le temps de stockage, les dommages aux enveloppes des graines, la présence d'oxygène et de dioxyde de carbone, la composition du substrat, la prédominance d'espèces toxigènes, la dispersion des spores, les interactions microbiennes et la présence d'insectes (Pitt et al., 1997 ;Pfohl-Leszkowicz, 1999).

L'origine chimique des mycotoxines est très diverses certaines dérivent, des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine), des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine. acide pénicillique, stérigmatocystine, zéaralénone), des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, désoxynivalénol, roridines, toxine T-2, verrucarine) ou encore des dérivés d'acides gras (fumonisines, alternariol) (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

(M. NGUYEN MINH TRI 2007)

Les aliments contaminés par les mycotoxines peuvent être classés en deux grands groupes selon leur lieu de production :

- Les mycotoxines de champs : elles envahissent la matière végétale avant la récolte on peut citer en exemple les Fumonisines principalement produites par le genre *Fusarium*.

- Les mycotoxines de stockage : envahissent la matière végétale entreposée (foin, ensilage) après la récolte exemple La Citrinine et la Patuline sont produites essentiellement par les genres *Penicillium* et *Aspergillus*. (afssa2006).

La consommation d'aliments contaminés par des mycotoxines peut entraîner l'apparition de mycotoxicoses. Ces dernières peuvent affecter des animaux sensibles et parfois des hommes. Elles sont généralement thermostables et ne sont pas détruites par les procédés habituels de stérilisation.

1.3 Les principales mycotoxines

La Food and agriculture organization of the United nations (FAO) a estimé que 25% des cultures alimentaires dans le monde sont affectés par des mycotoxines (Brochard et le Bacle 2009).

Les groupes de mycotoxines considérés comme importants du point de vue agro-alimentaire et sanitaire sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les trichothécènes, les fumonisines, la zéaralénone et la patuline.

1.3.1 Aflatoxines

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites par *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. Les champignons *Aspergillus flavus* produisent les aflatoxines B1 et B2, alors que *A. parasiticus* produisent les aflatoxines B1, B2, G1 et G2. Ce sont des composés extrêmement toxiques, mutagènes et cancérogènes. Les conditions les plus favorables à leur élaboration sont une activité en eau faible (0,84 -0,86) et des températures élevées comprises entre 25 et 30°C. *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton, tandis qu'*A. parasiticus* est présent surtout dans les graines d'arachide. Ce sont des mycotoxines produites après la récolte puisque issues de moisissures qui se développent lors du stockage ou du transport sauf pour le maïs ou Les aflatoxines ne sont cependant pas uniquement produites lors du stockage mais aussi avant la récolte.

1.3.2 Trichothécènes

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par plusieurs espèces de *Fusarium* et de genres apparentés. Au sein de cette famille de mycotoxine, les plus couramment détectés dans les produits agricoles sont le

déoxynivalénol (DON encore appelé vomitoxine), la toxine T-2, le nivalénol (NIV) et le diacétoxyscirpénol (DAS). Ces mycotoxines sont divisées en quatre groupes A, B, C et D dépendamment de leur structure chimique. Les groupes A et B sont les groupes les plus importants puisque le groupe A regroupe le DAS et la toxine T-2 qui n'ont pas de fonction cétone en C8 et le groupe B regroupe le nivalénol (NIV) et le DON qui en ont une fonction cétone en C8.

La contamination par ces mycotoxines survient avant la récolte, puisque les moisissures du genre *Fusarium* parasitent les plantes aux champs et sont très répandues dans les régions tempérées et humides. Certains Trichothécènes peuvent provoquer une irritation des muqueuses, en particulier des muqueuses digestives (labiale, intestinale...). Les intoxications les plus importantes sont associées aux NIV, DAS, DON.

1.3.3 La Zéaralénone

Est une mycotoxine produite par des *Fusarium* (principalement *F. graminearum*, mais aussi *F. proliferatum* ; *F. culmorum*) qui, sous de conditions humides et fraîches, se développent sur des céréales comme le maïs, l'orge.

La contamination par la mycotoxine débute au champ et peut se poursuivre au début du stockage si les conditions de conservation ne sont pas rapidement instaurées (ensilage, maïs grain...) ou dans le cas de ré-humidification (orge en malterie).

1.3.4 Ochratoxine A (OTA)

L'ochratoxine A (OTA) a été découverte pour la première fois chez *A. ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965). Elle est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, etc.) et *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, etc.). Le genre *Aspergillus* est bien adapté pour les climats chauds alors que *Penicillium* se développe bien dans les climats tempérés. C'est pour cette raison que la présence d'OTA a été détectée dans de nombreux produits agricoles de différentes régions du monde (Smith et al, 1994).

Cette mycotoxine est tératogène chez l'animal. Elle provoque, par exemple, des anomalies morphologiques diverses chez les jeunes ruminants. L'OTA affecte l'immunité cellulaire et humorale.

1. 3.5 Les fumonisines

Les fumonisines sont produites par plusieurs espèces de moisissures du genre *Fusarium*; on en connaît un certain nombre de types différents, mais les fumonisines B1, B2 et B3 (également appelées FB1, FB2 et FB3) sont les principales formes rencontrées dans les aliments.

Les champignons *Fusarium verticilloides*, *F. proliferatum* et *F. fujikuroi*, ainsi que certaines espèces moins connues du genre *Fusarium*, sont des contaminants courants du maïs, et dans une moindre mesure du blé et d'autres céréales, y compris leurs produits dérivés. On les rencontre partout dans le monde, mais le plus souvent sous les climats chauds et dans les zones tropicales chaudes où l'on cultive du maïs.

Les fumonisines peuvent avoir des effets importants sur la santé du cheptel et d'autres animaux elles sont hépatotoxiques (augmentation des enzymes hépatiques plasmatiques) et entraîne une diminution de l'ingestion, donc des performances zootechniques. Ces toxines sont considérées comme tumeur-promotrices et carcinogènes chez l'homme.

1.3.6 La Patuline

Encore appelée Clavacine, est un antibiotique élaboré par de nombreuses espèces fongiques. Par ordre décroissant : *Byssoschlamys nivea*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium granulatum*. La patuline est de loin la mycotoxine connue la plus fréquente dans les ensilages.

Des études ont démontré que, même en anaérobiose, *B. nivea* peut produire cette toxine, et que ce risque de pollution est important surtout après trois mois de conservation. Cette mycotoxine (clavacitoxicose) serait responsable, selon de nombreux auteurs, de troubles nerveux (ataxie, paraplégie).

Chez le mouton, l'intoxication expérimentale se traduit par du jetage, l'arrêt de la rumination, une sensibilité douloureuse rétro sternale, une inappétence prolongée et de l'amaigrissement.

1. 3.7 Les Alcaloïdes de l'ergot, (ergotamines...)

Sont des mycotoxines produites par des moisissures du genre *Claviceps* (*C. purpurea*, *C. fusiformis* et *C. paspali*) et *Neotyphodium* (*N. lolii*, *N. coenophialum*).

A la différence des *Claviceps*, les *Neotyphodium* sont des champignons endophytes qui se développent à l'intérieur des tissus de la plante et ne provoquent donc pas de lésions visibles sur la plante. Les principales circonstances d'intoxication des ovins par des ergo- alcaloïdes sont la consommation, soit de restes de graminées (poacées) utilisées pour la production de semences fourragères ou des semences à gazon (fétuque élevée) qui contiennent des endophytes, soit en consommant des céréales auto-produites (non triées) contaminées par de l'ergot de seigle (*C. purpurea*). La réglementation a prévu un seuil maximal de 1000 ppm pour l'ergot de seigle (*C. purpurea*) pour les matières premières et les aliments destinés aux animaux (directive 2002/32/CE).

**Chapitre 02 : Devenir et bioconversion des
mycotoxines dans l'organisme.**

Chapitre 2 : Devenir et bioconversion des mycotoxines dans l'organisme.

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

Cependant plusieurs situations rendent le rumen moins efficace : une ration riche en concentrés, un niveau d'ingestion élevé, une vitesse d'ingestion élevée et un transit rapide.

Ainsi, parmi les ovins, on définit des animaux plus sensibles, qui sont les jeunes de moins de 6 mois, les femelles en période péripartum. La période autour du vêlage est à risque car il y a à la fois une baisse de l'immunité, une transition alimentaire ainsi qu'un déficit énergétique.

2.1 Dans le rumen

Les ruminants sont globalement plus résistants à la plupart des mycotoxines que les animaux monogastriques. Ce phénomène s'explique par le rôle détoxifiant de la population microbienne du rumen.

Les toxines T-2, HT-2, DON et DAS sont toutes dégradées en présence de contenu de rumen (Prelusky et al 1987). Le DAS est dé-acétylé en monoacétoscirpénol (MAS) et en scirpènetriol, puis en dé-époxy MAS et dé-époxy-scirpènetriol.

La T-2 est transformée en HT-2 et en néosolaniol, respectivement de toxicité similaire et 10 fois moindre que la molécule mère.

Le cycle époxy du DON est ouvert pour donner le dé-époxy DON, appelé communément DOM-1, de toxicité inférieure.

L'OTA est métabolisée dans le rumen en phénylalanine et en ochratoxine alpha qui n'est pas toxique. Elle peut également être estérifiée en ochratoxine C (Galtier et Alvinerie 1976) de toxicité équivalente.

La ZEN est majoritairement transformée (plus de 90 %) en alpha-zéaralénol dont la toxicité est environ 10 fois plus forte que celle de la toxine mère et, à un degré plus faible, en beta-zéaralénol qui est peu toxique.

La dégradation des aflatoxines dans le rumen est généralement faible, inférieure à 10 % pour des doses de 1 à 10 µg/ml. Auerback *et al* (1998) ont observé la formation d'aflatoxicol, dérivé hydroxylé de l'AFB1 dont la toxicité est élevée. De nombreuses bactéries sont complètement inhibées par moins de 10 µg/ml d'AFB1, il est donc raisonnable de penser que la croissance et le fonctionnement des micro-organismes du rumen puissent être perturbés par cette toxine.

L'action du rumen est fortement sous la dépendance du type d'alimentation qui peut modifier l'équilibre de l'écosystème microbien. Ainsi, la capacité de dégradation de l'OTA chute de 20 % dans le cas d'une ration très concentrée par rapport à une ration à base de fourrage (Kiessling *et al* 1984).

Les protozoaires semblent plus efficaces que la fraction bactérienne dans le métabolisme des mycotoxines mais sont également plus sensibles à leurs effets. Des bactéries comme *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium* et *Anaerovibrio lipolytica* sont même capables d'utiliser des toxines comme source d'énergie grâce à l'existence de systèmes enzymatiques particuliers (Westlake *et al* 1987b).

2.2 Dans l'épithélium intestinal, foie et les reins

L'épithélium intestinal, le foie et les reins sont le siège de biotransformations d'un grand nombre de composés impliquant deux phases de réactions.

La première phase fait intervenir des réactions de réduction, d'oxydation et d'hydrolyse. Les cytochromes P450 microsomaux, les mono-oxygénases contenant de la flavine, des synthésases de prostaglandines, des amines-oxydases et des alcools déshydrogénases sont les enzymes majeures impliquées dans les oxydations. Tandis que les réactions réductrices sont

gouvernées par des époxyde-hydrolases, et des aldéhydes réductases ou cétone-réductases. La deuxième phase comporte les réactions de conjugaison des molécules formées durant la première phase. Ces réactions diminuent la toxicité et augmentent la solubilité dans l'eau des mycotoxines, ce qui facilite leur excrétion dans l'urine (et dans le lait) et protège l'animal.

Les enzymes majeures de conjugaison sont des glucuronosyl-transférases microsomales et des sulfonyl-, méthyle-, aminoacyl-, S-glutathione- et N-acétyl-transférases cytosoliques (Galtier 1999).

Toxine	Oxidation		Réduction	Hydrolyse	Conjugaison	
	P450	Non déterminée			Glucuronide	Autre
AFB1	Epoxyde AFM1 AFP1 AFQ1		AFLATOXICOL		AFM1 AFP1 AFQ1	Epoxyd-e
OTA	4 OH- OTA			OTAA		
T-2		3 OH-T-2 3 OH-HT-2 3 7diOH-T-2 3 7diOH-HT-2		HT-2 Néosolaniol T-2 triol T-2 tétraol Métabolites déépoxylés	HT-2 Neosolaniol	
DAS				MAS Scirpenetriol Métabolites déépoxyles		
DON				DOM-1		DON DOM-1
ZEN			α -zéaralénol β -zéaralénol			
FB1			FB1 monoester FB1-aminopentol			

Tableau 01 : Voies majeures de bioconversion des mycotoxines dans les systèmes biologiques (adapté d'après Galtier 1999).

Chapitre 3 :

Aspect clinique de la maladie

Chapitre 3: Aspect clinique de la maladie

Les mycotoxines ont des effets néfastes sur la santé et la production des animaux de rente. En effet, ces toxines fongiques ont des propriétés cancérigène, mutagène, tératogène, oestrogénique, neurotoxique ou immunosuppressives. Ces propriétés engendrent des pertes considérables avec notamment l'apparition de pathologies aiguës si la concentration en mycotoxines des aliments distribués est suffisamment élevée. Cependant, le principal problème réside dans les atteintes sub-cliniques. Celles-ci apparaissent à des concentrations en mycotoxines plus faibles qui, associées à des facteurs de stress, engendrent des pertes de rendement, des incidences accrues de maladies opportunistes ou des baisses des fonctions de reproduction. Ces atteintes sub-cliniques sont pour l'éleveur, d'un point de vue économique, bien plus importantes que les pertes dues aux effets aigus des mycotoxines.

3.1 Principaux effets non spécifiques des mycotoxines

On distingue principalement trois effets non spécifiques :

a) Diminution de la consommation alimentaire

Par diminution de l'appétence de l'aliment ou par irritation de l'appareil digestif et par conséquent, diminution de l'apport en éléments nutritifs. On observe alors des troubles de l'ingestion et des troubles métaboliques entraînant :

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

Il y a aussi une perturbation du métabolisme des éléments nutritifs (par exemple, la toxine T-2 inhibe la synthèse protéique). Les conséquences seront des troubles de fonctionnement du rumen et des troubles digestifs tels que :

- Diarrhées, hémorragies digestives.

-Bouses hétérogènes.

b) Effets sur le système endocrinien et les glandes exocrines

C'est le cas pour la zéaralénone principalement. On assiste alors à des troubles de fécondité avec :

- Retard des retours en chaleur, kystes ovariens et avortement.

c) Immunosuppression : entraînant une

- Moindre réponse aux vaccins
- Sensibilité accrue aux infections
- Réactivation d'infections subcliniques
- Perte d'efficacité thérapeutique

Tout ceci étant augmenté lors de la production de corticoïdes endogènes en réponse au stress ainsi qu'en période entourant le vêlage.

3.2 Signes cliniques attribuables aux différentes mycotoxines en élevage ovins

a) Aflatoxine

Ce sont des mycotoxines extrêmement toxiques, mutagènes et cancérigènes. Elles ont un effet immunodépressif sur le bétail qui engendre une résistance moindre aux maladies et une moins bonne efficacité des vaccins sur le cheptel . Une aflatoxicose aiguë, possible chez l'ovin, engendre d'importantes lésions du foie induisant des congestions et des hémorragies. Elle est à l'origine d'accumulation d'acides gras dans le foie, le rein et le cœur mais aussi d'encéphalopathies et d'œdèmes. L'animal peut mourir en quelques heures ou quelques jours.

Le plus fréquemment, les ruminants sont atteints d'une toxicose chronique qui cible principalement le foie. Ces toxines fongiques agiraient comme des intercalant ADN qui, en se liant aux bases, entraîneraient la mort de la cellule ou sa transformation en tumeur maligne.

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA-EFSA) atteste que la teneur réglementaire de 0,020 mg d'AFB1/kg d'aliment (Directive 2002/32/EC) n'a aucun effet sur la santé des ruminants. Toutefois, l'Autorité

précise qu'une exposition longue à de concentrations faibles d'AFB1, pourrait conduire à des fibroses hépatiques et des tumeurs du foie : ces conditions auraient été à l'origine de la formation de carcinomes hépatiques chez des moutons élevés en dehors de la zone européenne.

b) Ochratoxine

Une mycotoxicose par l'ochratoxine est rare, grâce à la situation du rumen en amont de l'intestin et à la capacité des microorganismes du rumen à hydrolyser l'OTA en OTnon toxique, les ruminants seraient peu sensibles à l'OTA. Cependant l'OTA a une action néphrotoxique lors d'une exposition aiguë et prolongée. Au niveau immunitaire l'un des effets les plus notables de l'OTA est la diminution de la taille des organes lymphoïdes (Bondy et Pestka, 2000 ; Al-Anati et Petzinger, 2006a). L'OTA agit également sur les cellules de la moelle osseuse. Une hypocellularité globale ainsi qu'une diminution des cellules souches pluripotentes (CFU-S) et des progénitures hématopoïétiques a été décrite par Boorman *et al.*

c) Trichothécènes

Tout comme les aflatoxines, ils possèdent des propriétés immunosuppressives intervenant autant sur le nombre de cellules de l'immunité que sur leur capacité immunitaire. La toxine T-2 comme le DON inhibent la synthèse protéique et entraînent une mort cellulaire dans les organes touchés. Ces mycotoxines provoquent une perte de poids, des dermatoses sévères et des hémorragies pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal.

d) Les fumonisines

Chez toutes les espèces animales testées, la fumonisine B1 a été mise en relation avec une gamme étendue d'effets sanitaires, touchant en particulier le foie et les reins. On s'inquiète spécialement du potentiel cancérigène de cette toxine, que l'on pense attribuable à une perturbation du métabolisme des graisses entraînant un épuisement de celles appelées sphingoïdes complexes et une accumulation de celles dénommées bases sphingoïdes et des métabolites de ces bases. Chez les ruminants, la FB1 est peu ou pas biotransformée par les microorganismes du rumen. Des différences de sensibilité difficiles à expliquer existent entre espèces de ruminants ou types de

production. Les ovins seraient particulièrement sensibles à la FB1. Des troubles de la fonction hépatique (dès 150 mg/kg d'aliment), ainsi ont été décrits accompagnées d'une augmentation de l'aspartate amino transférase, de la gamma glutamyl transpeptidase, de la lactate déshydrogénase, de la bilirubine et du cholestérol.

e) Patuline

La patuline a été initialement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques et antimicrobiennes à l'égard de nombreux microorganismes (Madhyastha *et al.*, 1994), mais sa toxicité a limité son développement médical ou vétérinaire.

La patuline présente à la concentration de 20 mg/L dans le rumen a un effet antibiotique sur les microorganismes du rumen et inhibe partiellement la digestion ruminale. Elle inhibe la croissance à la fois des bactéries gram positif et gram négatif, ainsi que celle des protozoaires *Bacillus brevis* semble particulièrement sensible à l'action antibiotique de la patuline (Wouters et Speijers, 2003).

La patuline possède également une action cytotoxique à l'égard des protozoaires libres comme *Tetrahymena pyriformis* (Nishie *et al.* 1989). Bien qu'aucune étude spécifique n'ait été réalisée sur des microorganismes isolés du rumen, sa présence dans les aliments consommés par le ruminant est susceptible d'avoir un effet négatif sur l'écosystème microbien ruminale. Plusieurs expérimentations ont été conduites *in vitro* pour mesurer l'effet de la patuline sur la digestion et la production de métabolites fermentaires dans le rumen. Escoula (1992) a montré que la patuline avait un effet négatif sur la production d'acides gras volatils, d'acétate en particulier, et sur la synthèse de protéines microbiennes mesurée avec des doses variant de 20 à 300 µg/ml.

f) ALCALOÏDES DE L'ERGOT

Ergotisme du à *C. purpurea* : On distingue deux formes d'intoxications liées à la consommation d'aliments contaminés par l'ergot de *C. purpurea*.

La forme convulsive se caractérise par hyperexcitabilité, titubations, spasmes, tétanies, paralysies, suivis parfois de la mort. Elle s'observe le plus souvent lors d'intoxications aiguës.

La forme gangreneuse dont les signes (poil terne, gangrène sèche ou humide) apparaissent d'abord aux extrémités du corps, s'observe lors d'une

exposition chronique aux toxines. La vasoconstriction entraîne une nécrose des tissus, extrémités des pattes, oreilles et queue, qui peuvent tomber dans certains cas. Ceci s'observe d'autant plus que la température est basse. des difficultés respiratoires, une hyper-salivation, des diarrhées voire des saignements digestifs sont également rapportés.

LES PRINCIPALES MYCOTOXINES						
Moisissure	Mycotoxine	Toxine	Plante ou aliments	Condition	Mécanisme d'action	Symptômes
Mycotoxines liées à la consommation de céréales oléagineux et protéagineux						
Aspergillus flavus et A. parasiticus.	Aflatoxine	AFB1 AFB2 AFG1 AFG2	Céréales riz arachide sorgho	Chaleur (T>25) Humide Stockage	Hépatotoxique Dose:hépatite aigue Dose: hépatocarcinome	Deux forme : Hépatite aigue avec cytolysé cholestase ictère Forme chronique : Insuffisance hépatique ascite et tumeur hépatique La résistance aux infections
A. ochraceus P. viridicatum	Ochratoxine	Ochratoxine	Céréales	T élevée Stockage Humide	Néphrologique	Insuffisance rénale et fibrose interstitielle
F. graminearum, F. sporotrichoides, F. culmorum	Trichothecene	Déoxynivalé nol Toxine T2	Céréales blé orge maïs	Climats froid et humide	Dérmatoxique Hématotoxique	Gastroentérite hémorragique. Immunosuppression Perte d'appétit
F. graminearum, F. culmorum	Zeralenone	Zeralenone	Céréales (surtout maïs)	Climats tempérée	Ostrogénique	Trouble de la reproduction : problème d'infertilité et infection de système reproducteur
Mycotoxine liées a la consommation herbe, fourrage et paille						
Claviceps purpurea et C. paspali.	Alcaloïde (toxine de l ergot)	Acide lysergique et dérivés (ergotamine)	Grains ergotés : céréales (surtout seigle) herbes (ray-grass)	Printemps froid et humide suivi d'une période de sécheresse.	Vasoconstricteur Neurotoxique	anorexie, un retard de croissance, une agalaxie. nécrose des extrémités. des signes nerveux tels ataxie, convulsions ou paralysies. Démarche chancelante.
Mycotoxine liée a la consommation d'autre aliment						
Aspergillus clavatus, Penicillium cyclopium, Byssochlamys nive	Patuline	Patuline	Ensilages, céréales germées	Erreur de conservation	Inhibe les enzymes Perturber la flore digestif	des signes nerveux, hyperesthésie, incoordination motrice, paraplégie et des coliques

Tableau 02 : (Schlumberger, 2016)

AUTRE MYCOTOXYNE						
Moisissure	Mycotoxine	Toxine	Plante ou aliment	Condition	Mécanisme D'action	Symptômes
Mycotoxine liées a la consommation herbe, fourrage et paille						
<i>Pithomyces chartarum</i>	Sporidesmine (Eczéma facial)	Sporidesmine	Ray- grass Pâturage naturels	Automne humide a près été sec ou fin	Hépatotoxique	Congestion et tuméfaction (face, oreille, vulve, zone glabre) nécrose cutanée ,ictère .

				été.		Photosensibilisation. Arrêt brutal de la production de lait. Cystite ulcérate avec néphrose secondaire. La mortalité survient par choc et stress si les animaux ne sont pas mis à l'obscurité.
Rhizoctomi-a leguminicol-a	Slaframine	Slaframine	Légumineuse	Automne, sur-pâturage	Parasympathomi métique	Sialorrhée, conjonctivite, polyurie diarrhée. Météorisation et anorexie
/	Dicoumarol	Dicoumarol	Méillot moisi, Flouve odorante humide, Férule commune	Stockage humide	Anticoagulant par action antivitamine K	Hémorragies
Pseudopez-iza medicaginis Leptospha- erulina – briosiana	Coumestrol	Coumestrol	Légumineuse Fourrage	Automne	Ostrogénique	Trouble de la reproduction Diminution de fertilité (pas d'avortement)
Stachybotrys chartarum	STACHYBOTRYO TOXINES	Verrucarine J, Roridine E, Satratoxine F, G et H	Pailles, Fourrage	Stockage Humide et froid	Dermotoxique Hematotoxiqu-e	Gastroentérite hémorragique Leucopénie
Acremoniu-m coenophial-um	/ Fescue disease foot	Lolitrem, paspalitem territrems	<i>Festuca arundinacea</i> Endophyte	Printemps et été sec	Vasoconstricte- ur	retard de croissance, rougeur, gonflement au dessus du sabot conduisant à des boiteries et refus d'alimentation, nécrose de la pointe de la queue.
Acremoniu-m lolli	/ Rye grass stagger disease	Lolitrem, paspalitem, territrems	<i>Lolium perenne</i> Endophyte	Pâturages extensifs l'été	Neurotoxique	Démarche chancelante Convulsions
Mycotoxine liée a la consommation d'autre aliment						
Fusarium solani.	Ipomeanol	Ipomeanol et dérivée	Pomme de terre	Erreur de conservatio-n	Pneumotoxiqu-e	Oedème aigu du poumon avec dyspnée, tirage costal, augmen- tation de la fréquence respiratoire L'auscultation révèle la présence de râles bronchiques

Tableau03 : effet des autres mycotoxines sur les ovins (Schaumberger,2016)

3.3 Le seuil de toxicité

La pathologie observée dépend des toxines présentes (type, synergie quantité et durée d'exposition), de la sensibilité de l'animal (âge, stade physiologique statut sanitaire, statut immunitaire, statut nutritionnel) et de l'environnement (météo, confort, stress,) (ARZUL P., 2010). À titre d'exemple, la présence d'acide fusarique peut accentuer les effets de la DON. Une autre preuve de ce phénomène provient du fait qu'un aliment contaminé par de la DON pure fabriquée en laboratoire présentait moins de toxicité qu'un aliment naturellement contaminé de niveau similaire (Smith, 1991).

Il est difficile de relier les signes cliniques à une mycotoxine déterminée car les poly-contaminations sont fréquentes. Par exemple, le laboratoire BIOMIN a

analysé des échantillons d'aliment contaminé, dans différents pays, les résultats sont répertoriés ci-dessous

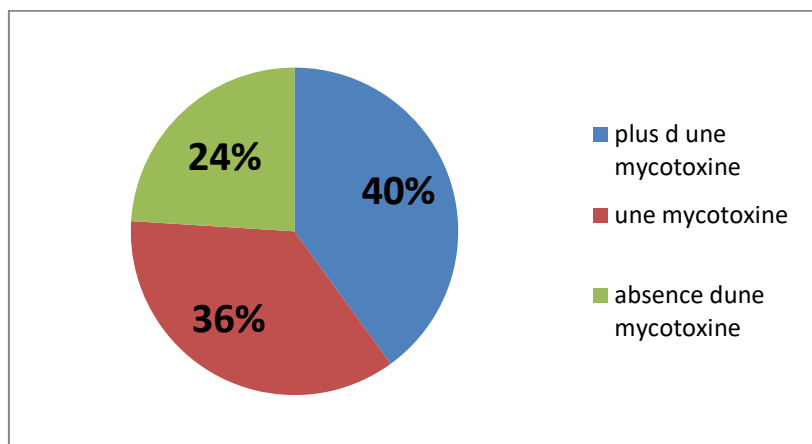
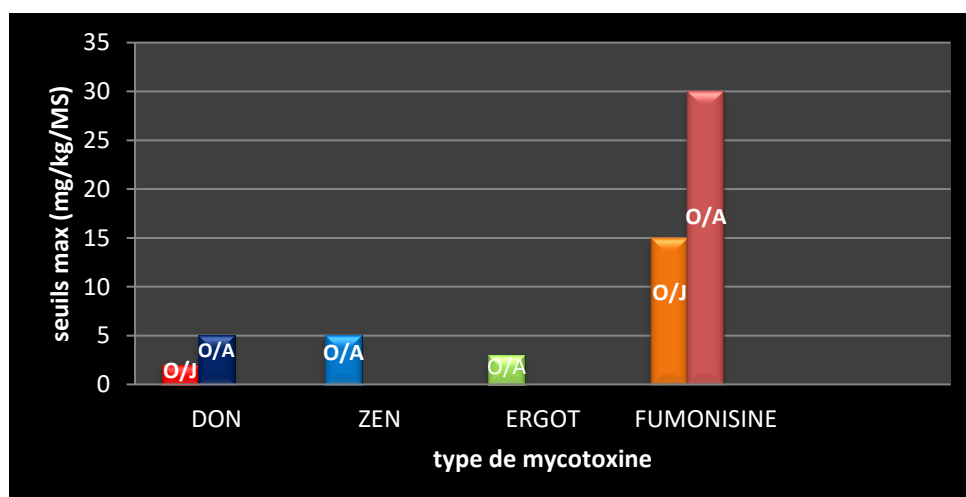


Figure 01 : Cas mondiaux d'aliments contaminés par des mycotoxines et analysés par le laboratoire Biomin en 2009 (BIOMIN, 2009)

Pour toutes ces raisons, le seuil de toxicité des différentes mycotoxines est très difficile à établir avec précision. Il est important d'établir sur quel critère ce seuil est basé (réduction de performance de x %, mortalité, paramètres sanguins, etc.). La figure 02 présente un aperçu des seuils de toxicité de certaines mycotoxines rapportés dans la littérature.



Données : O/J (ovins jeunes) O/A (ovins adultes)

Figure 02 : seuils de tolérance recommandés de mycotoxines retrouvées dans les aliments du bétail (Charmley , Trenholm ,2000) .

Chapitre 4 : Présence de mycotoxine dans l'aliment

Chapitre 4 : Présence de mycotoxines dans l'aliment

Les fourrages constituent une part importante de la ration des ruminants. Parmi les facteurs affectant la qualité hygiénique des fourrages, c'est la contamination par les moisissures qui est la plus importante. Dans certaines conditions climatiques ou de mauvaise conservation, ces moisissures peuvent se développer et conduire à une diminution de la valeur alimentaire des fourrages et à une production de mycotoxines pouvant être néfaste à la santé des animaux et de l'homme.

Le développement fongique et/ou la production de mycotoxines sont principalement régis par des facteurs environnementaux, notamment la teneur en eau du fourrage, la température mais aussi le degré de confinement durant la conservation. Si la croissance d'une moisissure peut s'effectuer sur la quasi-totalité des substrats en présence d'humidité, les conditions pour la production de mycotoxines sont beaucoup plus strictes. Le couple teneur en eau - température des fourrages au moment de la récolte et durant la conservation est déterminant pour la colonisation ultérieure par les moisissures.

Une teneur en eau supérieure à 15% pour un foin et inférieure à 65% dans un ensilage pourrait altérer leur qualité hygiénique. La plupart des moisissures ont des optimums de croissance entre 20 et 25°C. Certaines espèces thermophiles peuvent même se développer à des températures supérieures, c'est le cas de l'*A. Fumigatus*, espèce fréquente des fourrages conservés. Mais d'autres espèces psychrophiles (adaptées au froid), comme la majorité des espèces de *Penicillium* et certaines espèces de *Fusarium*, peuvent se développer à des températures bien inférieures (10-15°C). La température optimale de toxinogénèse est généralement voisine de celle de la croissance ; elle dépend de l'espèce fongique. Par exemple, la production des aflatoxines (AFs) se fait à des températures supérieures à 25°C, alors que celle de *Fusarium* et notamment de *Penicillium spp* se fait à des températures plus basses (15 à 25°C).

Pour la toxinogénèse c'est la nature du substrat, c'est-à-dire sa composition chimique en relation directe avec la richesse de la plante en glucides et secondairement en lipides, qui est primordiale. C'est pour cela que

le risque mycotoxique au champ est plus élevée quand la récolte est tardive, c'est-à-dire quand le végétal arrive à maturation et devient riche en nutriments (MILLS, 1989 ; OLDENBURG, 1993). (BOUDRA et MORGAVI, 2005).

4.1 Conséquences de la présence des mycotoxines dans les fourrages

Contrairement aux céréales, le développement des moisissures sur les plantes fourragères au champ est généralement discret et rarement responsable de la perte d'une récolte. Les pertes de fourrages sont surtout observées lors de mauvaises conditions de stockage. La perte peut être totale :

Fourrage détruit par le feu dans le cas du foin notamment ou rendu inconsommable. Mais, dans la majorité des cas, elle est partielle en raison d'un développement fongique localisé, qui s'accompagne souvent d'une diminution plus ou moins importante de la valeur alimentaire. Les pertes touchent essentiellement la quantité de matière sèche, les teneurs en glucides et en matières azotées [Boucon M 2016].

4.2 Impact économique des mycotoxines

La présence de mycotoxines dans les aliments, pose un problème de sécurité sanitaire des aliments. Un rapport de la FAO met en évidence le fait que la production céréalière mondiale est insuffisante pour répondre à la demande. Actuellement on estime qu'environ 25% des céréales produites actuellement à l'échelle internationale sont contaminées par des mycotoxines (Davegowda et al. 1998 ; thèse Zinedine, 2004). Ces pertes viennent amplifier le problème lié à une production insuffisante. L'impact économique des mycotoxines dans les pays en développement est vraisemblablement du même ordre que dans les pays industrialisés, voire plus important, en particulier dans les zones géographiques du globe les plus chaudes et les plus humides. Les pertes économiques se produisent en raison de la perte de rendement.

- 1) dus à des maladies induites par des champignons toxinogènes.
- 2) la valeur des récoltes réduites résultant d'une contamination par les mycotoxines.
- 3) des pertes de productivité des animaux, des problèmes de santé liés aux mycotoxines, et les coûts de la santé humaine.

L'impact financier des mycotoxines concerne non seulement les risques pour la santé de l'homme et des ruminants, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation. [BOUCON. M 2016].

a) Impact sur la santé publique

Peut d'étude ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact des mycotoxines sur la santé publique cependant certaines recherches ont démontrés que la viande et le foie des ruminants ayant consommés des aliments contaminés par de l'aflatoxine ne présentent pas de traces d'aflatoxines B1 ou M1, par contre des résidus d'aflatoxine M1 ont été retrouvés dans les reins. [AFSAA 2008].

4.3 Diagnostic

4.3.1 Les différentes méthodes d'analyses des champignons

4.3.1.1 Les difficultés du diagnostic fongique

- Les champignons sont ubiquitaires = difficile de différencier la colonisation de l'infection.
- Ce sont des Eucaryotes de structure complexe : difficulté de mettre en œuvre des outils diagnostics spécifiques.
- Leur culture est souvent lente : délai diagnostic, culture masquée par la culture de bactéries.
- Les températures optimales de croissance varient selon le champignon.
- Les charges fongiques sont faibles (problème des fongémies).

4.3.1.2 Culture

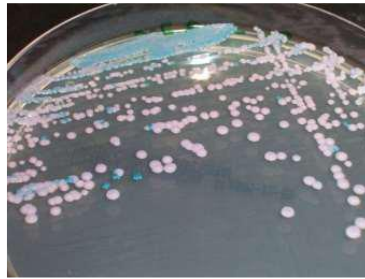
La culture reste actuellement la pierre angulaire du diagnostic des champignons. Elle seule permet une identification précise au genre et à l'espèce, ainsi que la détermination de la sensibilité aux agents antifongiques. Ce dernier test, appelé antifongigramme par analogie à l'antibiogramme, est de plus en plus demandé pour des espèces avec résistance connue, ou en cas de réponse thérapeutique insatisfaisante., une culture positive pour un champignon opportuniste comme *Candida* ou *Aspergillus* ne prouve pas automatiquement une infection à ces germes.

L'identification précise (au genre et à l'espèce) des champignons poussant sur les milieux de cultures fait appel à des tests de reconnaissance phénotypiques macroscopiques (morphologie et pigmentation des colonies) et

microscopiques (type de mycélium, présence de levures, filaments ou pseudo-filament).



Boite Sabouraud
Chloramphénicol
Gentamicine



Boite Sabouraud
Chloramphénicol
Gentamicine
Bleu de tétrazolium



Tube Sabouraud
Chloramphénicol
gentamicine

Examen de
Culture au
Bleu lactophinol



Détermination du genre et de l'espèce

Figure 03 : mise en culture et identification des champignons (Christine, 2009).

4.3.1.3 Techniques d'amplification moléculaire

La PCR permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique de longueur définie. Pratiquement, la PCR consiste en une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces qui définissent, en la bornant, la séquence à amplifier. L'amplification se fait grâce à une enzyme, la Taq polymérase, capable de synthétiser de l'ADN à partir des nucléotides présents dans la réaction en utilisant les produits de chaque étape de synthèse comme

matrice pour les étapes suivantes. Ainsi, l'amplification obtenue est exponentielle, et à partir d'une molécule d'ADN, il est possible d'obtenir un milliard de copies de cette même molécule. Après électrophorèse, les molécules amplifiées (amplicons) peuvent être visualisées sur un gel d'agarose à l'aide de molécules fluorescentes (bromure d'éthidium ou Sybr Green). Les amplicons peuvent aussi être détectés, en continu pendant la PCR, grâce à des sondes nucléiques spécifiques marquées avec des molécules fluorescentes (PCR en temps réel). Les PCR se sont révélées particulièrement utiles pour détecter l'ADN de micro-organismes difficiles à cultiver (par exemple : Pour la détection de champignons microscopiques. De plus, contrairement à la culture, la détection de l'agent infectieux par PCR n'est que peu influencée par quelques doses d'antibiotiques.

Il existe deux principales approches de PCR

- * une approche ciblée pour un micro-organisme avec des amorces spécifiques
- * une approche «large spectre» capable de détecter l'ADN de presque n'importe quelle bactérie ou champignon.

a. Détection à large spectre de l'ADN d'un agent microbien dans un échantillon clinique

Il est possible de détecter l'ADN de presque n'importe quelle bactérie ou champignon à l'aide d'amorces ciblant un gène très conservé. Cependant, ce type de PCR large spectre ne peut s'effectuer qu'à partir d'un échantillon stérile. Ces PCR sont appelées PCR eubactériennes lorsque les amorces permettent la détection des bactéries et PCR panfongiques pour les champignons. Il n'existe actuellement pas de test équivalent pour les virus, leur variabilité génétique étant trop importante.

En cas de PCR positive, les zones amplifiées sont séquencées et comparées à des millions de séquences présentes dans des banques de données afin d'identifier le micro-organisme. En conséquence, par comparaison avec les PCR spécifiques, les PCR à large spectre présentent un risque accru de contamination par les amplicons, une sensibilité moindre et un délai plus long pour obtenir un résultat (24-72 heures), en tout cas lors de positivité.

Ces PCR sont utilisées généralement pour identifier l'étiologie d'un syndrome infectieux pour lequel les examens microbiologiques classiques n'ont pu détecter l'agent causal.

4.3.2 Les différentes méthodes d'analyse des mycotoxine

4.3.2.1 Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique ou subclinique des mycotoxicoses chez les ruminants est très difficile à réaliser lorsque le niveau de contamination est faible (intoxication chronique) car les symptômes sont non spécifiques, vagues et peu fréquents. Très souvent, on s'aperçoit que les aliments sont contaminés sans que les animaux ne présentent pour autant de signes cliniques évidents (Morgavi et Riley, 2007). D'ordinaire, les mycotoxicoses provoquent une baisse du système immunitaire, une diminution de la consommation alimentaire ainsi qu'une augmentation des problèmes de reproduction (Whitlow et Hagler, 2008). À faible dose, certaines mycotoxines (et plus particulièrement les trichothécènes) stimulent le système immunitaire puisqu'elles provoquent une hausse des taux d'immunoglobulines A (IgA) plasmatiques et accentuent l'expression de plusieurs gènes liés à l'immunité telles que les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 (Azcona-Olivera et coll., 1995, Azconaolivera et coll., 1995, Ouyang et coll., 1996) ou encore des chémokines MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein)(Pestka et coll., 2004). En outre, certaines études démontrent que la malnutrition engendrée par une baisse de la consommation alimentaire (mauvais goût des aliments) suffit à provoquer une diminution des immunoglobulines sériques (Rotter, 1996, Banotai et coll 1999, Agag, 2005, Bryden, 2012). Au-delà de l'immunodépression, l'état de faiblesse induit par la cytotoxicité des mycotoxines entraîne une plus grande sensibilité aux maladies (Pitt, 2000). De plus, la présence simultanée de plusieurs mycotoxines susceptibles d'avoir des effets synergiques donne parfois lieu à des symptômes variables (Reboux, 2006). L'interaction des toxines avec d'autres facteurs liés à l'environnement et à l'animal (tel que le stress de production chez les vaches en début de lactation) peut également complexifier le diagnostic de mycotoxicose (Whitlow et Hagler, 2001, Yiannikouris et Jouany, 2002).

4.3.2.2 Diagnostic de laboratoire

Les mycotoxines ont un impact sur la santé des humains et des animaux ; par conséquent, il est important de mesurer leurs niveaux dans les matières premières. Ainsi, pour déterminer la contamination ou non d'un lot, il faut connaître la quantité de mycotoxines qu'il contient. Pour ce faire, trois étapes sont à suivre : l'échantillonnage, la préparation de l'échantillon et le dosage (Tazerout, 2016).

4.3.2.3 L'échantillonnage

La détermination précise des concentrations de mycotoxines dans les aliments dépend, de plusieurs facteurs. Il convient tout d'abord de circonscrire un échantillon représentatif de l'aliment ou du lot d'aliments (Whitaker et coll., 1991). Il a été démontré que les mycotoxines ne sont pas réparties uniformément dans les aliments destinés aux animaux (Whitlow et Hagler, 2001). Dans une proportion pouvant s'étendre à 90 % des cas, les erreurs diagnostiques des mycotoxicoses sont imputables à des défauts d'échantillonnage (Whitlow et Hagler, 2001). L'exactitude du résultat obtenu dépend essentiellement de l'échantillonnage, or il est difficile d'obtenir un échantillon représentatif dès lors que le processus s'appuie sur des graines entières ou insuffisamment mélangées. Une fois recueillis, les échantillons doivent être manipulés de façon à prévenir toute prolifération additionnelle des moisissures. (Tazerout, 2016).

Les facteurs requis pour assurer un échantillonnage représentatif sont résumés ci-dessous :

- Les échantillons doivent être collectés par du personnel formé et respectueux des consignes et des conditions indiquées dans le plan ou la procédure.
- Des outils appropriés comme indiqué dans le plan ou la procédure doivent être utilisés. Le bon respect des conditions environnementales (météorologie notamment) par exemple revêt une importance qui doit être elle aussi soulignée dans le protocole.
- Les échantillons doivent être pris seulement lorsque l'ensemble du lot est accessible (c'est normalement le cas lors du transport ou du déchargement) pour toujours permettre d'appliquer strictement la procédure. Chaque partie du lot doit avoir une chance égale d'être sélectionné.

- Le transport et la conservation des échantillons doivent permettre de respecter leur intégrité de ce fait la non transformation de l'analyte.
- Les bonnes pratiques d'échantillonnage nécessitent l'identification non ambiguë et sécurisée de l'échantillon et permettent de retrouver *a posteriori* au moins le nom du préleveur, le lieu de prélèvement, le numéro de lot, les outils utilisés, l'heure et la date et toute observation nécessaire à la bonne interprétation des résultats de mesure (Tazerout ,2016).

4.3.2.4 Les Méthodes Analytiques De Mesure

Il est important de souligner en préalable que l'analyse mycologique (recherche et identification des moisissures) n'est pas suffisante pour évaluer le risque d'une contamination par des mycotoxines puisque l'identification d'une espèce toxigène n'affirmera pas que l'on est en présence d'une souche productrice et que les conditions environnementales ont permis la production de toxines. Réciproquement, l'absence de spores n'indiquera pas que l'aliment n'est pas contaminé si des procédés technologiques ultérieurs ont pu faire disparaître toute trace de la moisissure. La mise en évidence des mycotoxines dans les aliments requiert l'utilisation de méthodes analytiques performantes, qu'il s'agisse de la préparation de l'échantillon, de la détection de l'analyte, de son identification, de son dosage ou encore de la confirmation de sa mesure et son identité. Elles doivent associer sensibilité, notamment lorsqu'il s'agit de quantifier des ultra-traces, et spécificité puisque la recherche des analytes est effectuée généralement dans des échantillons biologiques particulièrement complexes (céréales, produits laitiers...). Aucune méthode n'est réellement applicable à l'ensemble des mycotoxines, en d'autres termes être multi-résidus, tant les caractéristiques physico-chimiques des analytes – nature chimiques, poids moléculaire et polarité - sont variées. La qualité des dosages est primordiale et doit assurer la fiabilité des résultats. (Marc Fremy, Thomann 2009).

4.3.2.5 Les Types de méthodes et leurs principes généraux

L'analyse des mycotoxines dans les aliments, tout comme celle des autres résidus et contaminants de notre alimentation, est articulée autour de deux types de méthodes :

- celles qui permettent de discriminer, dans des délais brefs, les échantillons négatifs ou suspects. Ces méthodes dites de dépistage sont généralement

caractérisées par une excellente sensibilité mais peuvent être limitées en terme de spécificité. Le taux de résultats faux négatifs est par définition limité à un très faible niveau, alors que les faux positifs sont tolérés dans des limites raisonnables.

- celles qui permettent de confirmer ou d'infirmer la présence et l'identité d'un analyte suspecté lors de l'utilisation d'un test de dépistage. Ces méthodes dites de confirmation sont caractérisées par une sensibilité suffisamment bonne pour être à même de vérifier des suspicions générées en dépistage et de limiter le risque de faux négatif. Elles doivent être suffisamment spécifiques pour identifier à coup sûr la nature de la molécule recherchée et interdire toute conclusion erronée (résultat faux positif).

Il existe deux grands principes de méthodes qui peuvent être appliqués à l'analyse de traces de mycotoxines dans les aliments : les approches immunologiques et les approches physico-chimiques. (Marc Fremy, Thomann 2009)

- Les méthodes immunologiques:

Les méthodes immunologiques s'appuient sur la reconnaissance plus ou moins spécifique de l'analyte à doser (ici l'antigène Ag) par un anticorps produit et caractérisé pour inter-agir avec ce dernier. Ce principe est utilisé à la fois pour purifier les analytes cibles (colonnes d'immunoaffinité) mais également pour doser rapidement les mycotoxines en première intention (ELISA, RIA).

- Les méthodes physico-chimiques:

Ces méthodes à la fois utilisées à des finalités séparatives (extraction et purification de l'échantillon) ou analytiques (identification et dosage des analytes) s'appuient sur les caractéristiques structurales de la molécule, à savoir sa polarité ou sa taille, mais encore sa capacité à absorber dans l'UV ou à produire des signaux spectrométriques caractéristiques.

a) les tests immunologiques

Pour ces tests, la réaction est rendue possible par addition à l'échantillon du même antigène marqué (Ag*), de manière à ce qu'il y ait une compétition entre Ag et Ag* vis-à-vis d'un nombre limité de sites anticorps. Selon le marquage d'Ag* par une enzyme ou par de la radioactivité, la technique correspondante est respectivement désignée ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ou RIA (Radio Immuno Assay). La qualité de l'anticorps détermine la spécificité

du test, en d'autres termes son affinité et sa sélectivité vis à vis de l'analyte recherché quelle que soit la complexité de la matrice. Dans le cas le plus favorable, aucune étape préalable de préparation de l'échantillon n'est à envisager, ce qui contribue encore à diminuer le délai de rendu de résultats. Ces techniques ont l'avantage d'une grande rapidité de mise en œuvre, un coût réduit et enfin la possibilité de gérer un grand nombre d'échantillons dans une même série d'analyse. En revanche, les principaux reproches attribués à ce type de technique sont liés à la qualité de l'anticorps en termes d'affinité et de spécificité qui, lorsqu'elles sont faibles, contribuent à augmenter le risque de résultats erronés. Ce risque peut être amplifié par les divers constituants des matrices alimentaires et/ou la présence de traces de solvants qui peuvent perturber (ou interférer avec) la liaison Ag-Ac. Ceci signifie que ces méthodes nécessitent d'être caractérisées avant diffusion et utilisation et ne peuvent être considérées que comme des méthodes qualitatives de détection des toxines avec une portée semi-quantitative. Ceci implique nécessairement que l'échantillon soit soumis à une analyse de seconde intention surtout lorsqu'une concentration en analyte a été détectée ou a dépassé la valeur d'intérêt ou la limite réglementaire. (Marc Fremy, Thomann 2009)

b) Le test physico-chimique

b.1 La chromatographique

Au cours des dernières années, on a vu apparaître des méthodes d'analyse basées sur la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, ou basées uniquement sur la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Il s'agit de méthodes extrêmement sélectives et suffisamment sensibles pour détecter la présence de mycotoxines à des concentrations très faibles. Ces méthodes permettent aussi de quantifier simultanément plusieurs métabolites. En effet, le développement des techniques d'analyse de la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse a donné lieu à une avancée décisive dans l'étude des mycotoxines au cours de ces dernières années (Zöllner et Mayer-Helm, 2006). Les coûts de ces techniques sont en baisse et plusieurs laboratoires offrent désormais une large gamme de tests. Ces méthodes semblent s'imposer comme des techniques de choix pour l'analyse quantitative de la majorité des mycotoxines, mais non comme des techniques de choix en matière de détection. (Tazerout ,2016)

b.2 L'analyse des mycotoxines dans les aliments

Étant donné que l'analyse des mycotoxines dans les aliments est une méthode de diagnostic imparfaite due souvent à un échantillon non représentatif, on peut difficilement se faire une idée précise des taux de toxines ingérées et de leurs conséquences sur la santé et la production des ruminants. Ainsi, il pourrait s'avérer plus pertinent de doser les mycotoxines à partir de fluides biologiques des animaux afin d'obtenir un meilleur diagnostic des mycotoxicoses.

b.3 L'analyse des mycotoxines dans les liquides biologiques

L'analyse des mycotoxines dans les fluides biologiques des ruminants s'effectue essentiellement moyennant des techniques chromatographiques telles que la CCM (Chromatographie sur couche mince), la HPLC (Chromatographie liquide haute performance), la Chromatographie couplée ou non à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Le procédé comprend une extraction en phase solide, un nettoyage sur des cartouches puis la mesure de la toxine. Cette méthode est précise et reproductible et peut être utilisée comme une méthode multi-biomarqueur pour évaluer l'exposition des animaux à ces mycotoxines et pour le diagnostic des intoxications (Winkler et coll., 2014b).

Ainsi, la chromatographie est très intéressante pour valider des résultats obtenus au moyen d'autres méthodes. Elle est plus précise et elle réduit les interférences. Contrairement à la méthode ELISA, elle fait encourir moins de risques de faux positifs et de faux négatifs. Elle permet de détecter de faibles quantités de mycotoxines et d'atteindre des limites aussi basses que la dizaine de ppt (Zöllner et Mayer-Helm, 2006). En outre, le LC/MS/MS permet de doser plusieurs dizaines de mycotoxines en même temps.

Enfin, malgré l'évolution de la science en matière de quantification des mycotoxines, il semblerait que le diagnostic des mycotoxicoses reste difficile à poser à cause de la distribution non uniforme des mycotoxines dans les aliments et du manque de précision des tests diagnostiques en laboratoire (Songsermsakul et coll., 2006). De ce fait, la connaissance de ces facteurs est l'élément essentiel dont il faut tenir compte pour toute suspicion de mycotoxicose. Il est regrettable qu'il n'existe que si peu de moyens de mettre

en évidence la contamination des aliments par les mycotoxines dans les fermes. Les mycotoxicoses peuvent être suspectées dans tous les cas de maladies présentant des symptômes non spécifiques et résistants au traitement conventionnel. Ainsi, il n'est pas rare que le médecin vétérinaire invoque une intoxication aux mycotoxines en dernier recours, après que toutes ses autres hypothèses diagnostiques aient été écartées. (Tazerout ,2016)

Chapitre 5 : prévention et traitement

Chapitre 5 : Prévention et traitement

5.1 Prévention de la contamination des aliments par les mycotoxines

Le caractère ubiquiste des moisissures associé à la multitudes d'espèces susceptibles de produire des mycotoxines fait que l'élimination totale des mycotoxines n'est pas envisageable à court et moyen terme car il faudrait pour cela détruire des stocks considérables de produits agricoles des circuits de transformation et de distribution pouvant mettre en danger la suffisance alimentaire. L'objectif est de faire diminuer progressivement les concentrations de mycotoxines à des niveaux acceptables pour la santé des animaux et pour la santé publique. La prévention concerne les pratiques agricoles, les conditions de transport, de stockage et les procédés de fabrication. Prévention de la contamination des matières premières.

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

Les actions préventives les plus importantes sont à diriger vers les cultures, les terres et le stockage des aliments (Tableau 1). En ce qui concerne les cultures, le précédent cultural est important à prendre en compte. La contamination des blés par des trichothécènes est plus importante lorsque le blé est cultivé après un maïs que lorsqu'il est cultivé après un blé.

Pour les maïs, le risque de contamination par des mycotoxines est 2 fois plus élevé si la plante est cultivée 2 années de suite dans le même champ par rapport à une rotation des cultures. Ce risque est plus important après un maïs grain qu'après un maïs ensilage. Il faut éviter la monoculture de maïs. La culture de légumineuses entre deux cultures de céréales permet d'assainir le terrain et ainsi de rompre les cycles de contamination en réduisant le potentiel infectieux du sol.

Il faut choisir, de préférence, des espèces/variétés résistantes aux maladies et aux insectes. En effet, toutes atteintes des plantes représentent un point de départ pour le développement d'un champignon phytopathogène potentiellement sécréteur de mycotoxines. Notamment pour les *Fusarium* producteurs de fumonisines, qui peuvent contaminer les épis de maïs via les

soies comme tous les *Fusarium* mais également par les lésions provoquées par les insectes.

Le stockage des grains doit être réalisé au sec, et de telle façon à ce que de la condensation soit évitée. Si nécessaire une ventilation des silos de grains doit être mise en place. Pour les maïs grains, la dessiccation doit être la plus rapide possible après la récolte.[Laurent ALVES de OLIVEIRA 2012].

Terre & Cultures	Appliquer une rotation des cultures, éviter une céréale à paille derrière un maïs
Récolte & Ensilage	Récolter le maïs pas trop tard et pour tous les ensilages, pas sous conditions humides
	Nettoyer et sécher les silos avant d'y mettre les produits
	Fermer rapidement et de façon étanche les silos
	Utiliser un conservateur pour l'ensilage pour garantir une acidification rapide et un conservateur qui prévient le développement des moisissures.
Après récolte	Détruire (= broyer) et enfuir les résidus de cultures.
Gestion de la reprise des ensilages	Ouvrir, contrôler les surfaces du front d'attaque (photo 3 et 4), enlever les endroits suspects, avoir une vitesse d'avancement du front d'attaque suffisante (10 cm/j en hiver, 20 cm par jour en été).
Stockage	Stocker les grains dans un endroit sec

Tableau 04 : Quelques mesures de prévention et maîtrise des mycotoxicoles. [Laurent ALVES d'OLIVEIRA 2012].

5.1.1 Bonne méthode de stockage

Les bonnes pratiques de stockage ne sont pas les mêmes selon le type d'aliment. Dans le foin, le facteur limitant le développement des moisissures est la faible humidité (séchage rapide et humidité inférieure à 10-20%), alors que dans les ensilages, ce sont les conditions d'anaérobiose (tassage) et de pH (inférieure à 4). Pour les céréales, les facteurs limitant sont la température et l'humidité des grains (FANGEAT, 2008; YIANNIKOURIS A., 2002; LAUMONNIER, 2006).

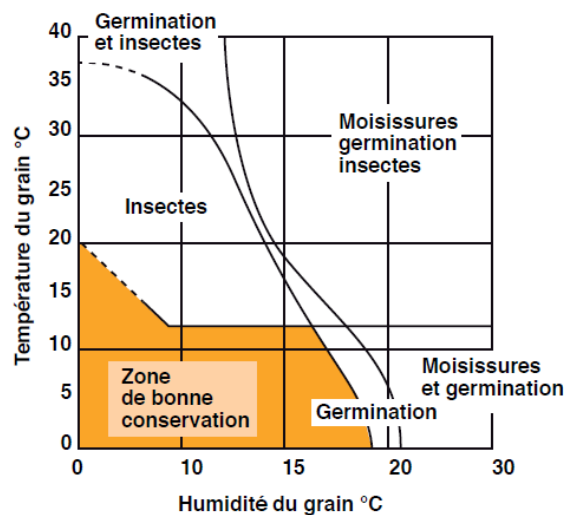


Figure 04 : Diagramme de conservation des céréales (Burges et Burrel, 1964)

5.1.1.1 Anaérobiose

Dès la mise en silo, il est très important de mettre l'ensilage dans des conditions d'anaérobiose précoces et durables (hachage fin, bon tassage, teneur en matière sèche pas trop élevée) et d'assurer un départ rapide de la fermentation (possibilité de rajouter des conservateurs) (BAILLY J.D., 2006). En effet, bien qu'aérobies obligatoires, les champignons peuvent continuer à respirer à des concentrations en oxygène de 4 % (DUQUESNOY, 2005).

Par exemple, la présence d'oxygène dans le front d'attaque ou dans le silo (formation de poches d'air) peut faciliter l'implantation de micromycètes (YIANNIKOURIS A., 2002) ; il est conseillé d'assurer une vitesse d'avancement du silo supérieure à 20 cm par jour (BAILLY J.D., 2006) et de limiter les temps de stockage (GRANCHER, 2011).

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

5.1.1.2 Absence d'humidité

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

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

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

5.1.1.3 Absence de terre

Il faut aussi éviter la contamination par la terre. Pour cela, il faut récolter par temps sec, régler la hauteur de la barre de coupe, ne pas faire monter les remorques sur le tas d'ensilage (ARZUL P., 2010). S'il y a contamination durant la récolte, l'infection se poursuit pendant la manipulation et la période d'entreposage. Le séchage, la ventilation et le refroidissement rapide des céréales contribuent à éviter d'aggraver la situation.

5.1.1.4 Les bâtiments et matériels

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

a. Précaution pour les bâtiments

Il faut vider, nettoyer et désinsectiser les installations avant chaque nouvelle récolte.

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

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

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

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

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

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

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

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

b. Précaution pour le matériel

Les conteneurs et véhicules servant au transport des céréales doivent être étanches et ils doivent être vidés et nettoyés

C. Protection du personnel exposé

La protection du personnel exposé repose sur le port de masque lors des activités les plus contaminantes, le port de gants, la surveillance médicale accrue.

5.1.1.5 Le nettoyage des grains

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

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

5.1.1.6 La ventilation

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

La conduite à suivre est la suivante :

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

Un différentiel d'environ 10°C doit séparer la température du silo de celle de l'extérieur. Si cet écart est inférieur, le refroidissement sera moins bon alors que s'il est supérieur, il peut y avoir formation de condensation Cette ré-humidification peut alors provoquer un début de germination (CENTRE DE DEVELOPPEMENT DU PORC DU QUEBEC, 2002). Si le refroidissement des céréales ne peut pas être réalisé efficacement, il faut traiter les céréales avec un produit insecticide (ANCEAU C., 2005). Avant chaque récolte (ANCEAU C., 2005).

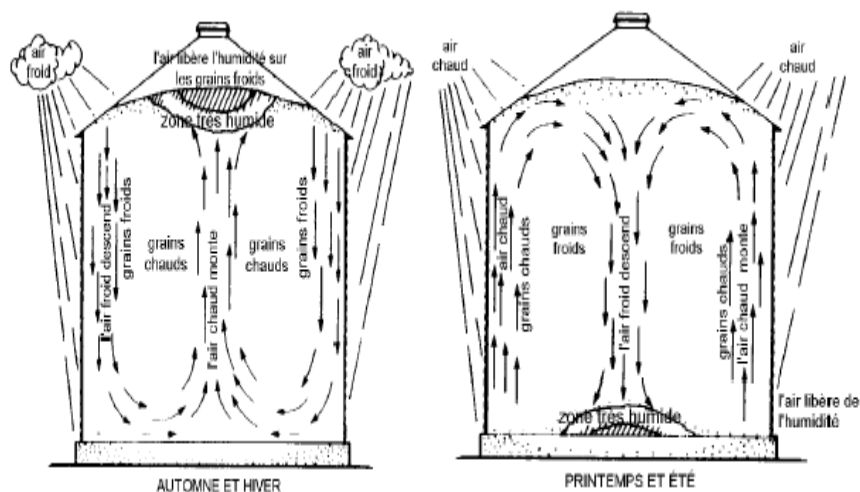


Figure 05 : L'aération des grains et la variation des zones d'humidité en fonction des saisons (OMAFRA, 2008)

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

La conduite à suivre est la suivante :

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

Un différentiel d'environ 10°C doit séparer la température du silo de celle de l'extérieur. Si cet écart est inférieur, le refroidissement sera moins bon alors que s'il est supérieur, il peut y avoir formation de condensation Cette ré-humidification peut alors provoquer un début de germination (CENTRE DE DEVELOPPEMENT DU PORC DU QUEBEC, 2002). Si le refroidissement des céréales ne peut pas être réalisé efficacement, il faut traiter les céréales avec un produit insecticide (ANCEAU C., 2005) avant chaque récolte (ANCEAU C., 2005).

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

5.1.1.7 L'alimentation des animaux

Il ne faut surtout pas nourrir les animaux avec les poussières et déchets de céréales car ils ont une probabilité élevée d'être hautement contaminés (AFSSA, 2009). En conclusion, la prévention se résume à de bonnes pratiques agricoles, qui sont à respecter entre la récolte et l'alimentation des animaux.

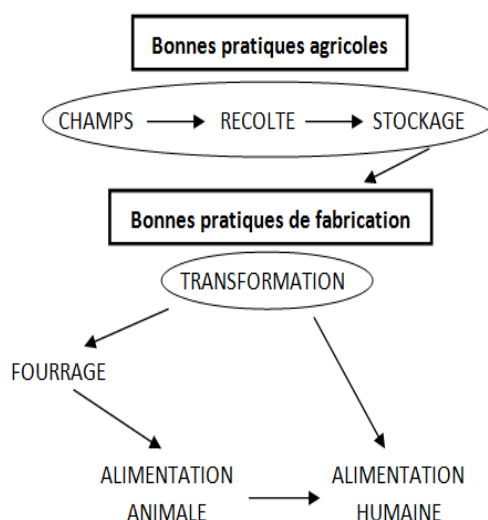


Figure 06 : Etapes clés pour la prévention contre les mycotoxines. (FORAISON ;2013)

5.2 Les traitements limitant les effets des mycotoxines

Il est certain que même avec tous les efforts possibles, dans certaines conditions, notamment climatiques, la contamination des aliments par les mycotoxines est inévitable. Cependant, il est parfois possible de décontaminer. Cette décontamination consiste à réduire, détruire voire supprimer les effets toxiques des mycotoxines le plus souvent en traitant les céréales après leur récolte. On classe en trois groupes les systèmes de détoxification.

- Les méthodes chimiques
- Les méthodes physiques
- Les ligands

5.2.1 Les méthodes chimiques

Ces méthodes regroupent tous les traitements chimiques utilisés après la récolte visant à détruire ou désactiver les mycotoxines. On trouve divers agents comme les acides et les bases (soude, ammoniac), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, ozone), des agents réducteurs (bisulfites), des agents chlorés, du formaldéhyde.

Ces agents sont utilisés surtout contre les aflatoxines. Cependant, les chercheurs s'interrogent sur les bienfaits de ce traitement qui, comme l'ammoniac par exemple, pourraient faire plus de mal que de bien. [FANGEAT Loïc 2008].

Effectivement, l'ammonisation a été adoptée par plusieurs pays grâce à sa capacité à décomposer complètement l'OTA présent dans le maïs, le blé et l'orge (Joint, 2001, Bhatnagar *et al.* 2003). Même si cette technique n'a pas abouti à la formation et l'accumulation des produits secondaires toxiques, son utilisation altère la nature organoleptique des denrées alimentaires traitées (brunissement des céréales, perte de lysine et d'autres acides aminés) (Joint, 2001, Varga *et al.* 1996, Huff and Hamilton, 1979). Par conséquent, de nos jours, son utilisation n'est plus recommandée vue ses effets secondaires sur la qualité des aliments traités (Joint, 2001). [R. El Khoury 2017].

Le traitement du DON et de la ZEN à l'ozone peut conduire à leur dégradation rapide sans production de coproduits détectables, tandis que la FB1 est dégradée en différents produits présentant encore une toxicité (McKenzie *et al.* 1997; Young *et al.* 2006). [FANGEAT Loïc 2008]

Méthode	Toxine	Efficacité
Acide et base		
Ammonisation	Aflatoxine	+++
Nixtamalisation	Aflatoxine	+
Nixtamalisation+ h2o2	Fumonisine	+
Oxydant et réducteur		
Eau oxygéné	Aflatoxine	+
Bisulfite	Aflatoxine	+
Glucose fructose	Fumonisines	+

+++ : Dénaturation et diminution importante de la toxicité ; + : effet bénéfique
TABLEAU05 : Efficacité comparée des méthodes chimiques de décontamination. *Revue Méd. Vét.*, 2000, **151**, 12, 1095-1106

a) Les fongicides

L'emploi de certains pesticides pour contrôler le développement des différents pathogènes semble être une méthode très efficace, ce qui a augmenté l'usage de ces composés depuis les années 1950. Malgré son efficacité, cette stratégie a montré des effets néfastes sur la biodiversité animale et végétale, ainsi que sur les être humains et les mammifères après une exposition prolongée à ces produits, et la perte de son efficacité par l'apparition des organismes résistants à ce traitement.

La stratégie de lutte contre l'occurrence des mycotoxines en utilisant des fongicides semble être la méthode la plus séduisante du point de vue efficacité et vitesse d'action (Norred, 1999). Dans les régions présentant des risques élevés, un traitement antérieur à la véraison est essentiel afin de lutter au maximum contre la contamination des produits cultivés, préférentiellement 21 jours avant la récolte. Cependant, l'application de certains fongicides peut induire une augmentation des taux d'OTA même s'ils sont capables de réduire la croissance fongique. A titre d'exemple, les fongicides comme le Carbendazim et le Clorus, qui ont inhibé la croissance d'*A. Carbonarius* d'une part, ont induit une augmentation de la production de l'OTA d'une autre part (Medina *et al.* 2007). [Rachel El Khoury 2017].

5.2.2 Les méthodes physiques

Parmi les méthodes physiques on trouve des techniques très diverses allant du simple tri et élimination des grains contaminés (exemple : élimination des grains ergotés qui flottent dans une solution saline) jusqu'à des méthodes plus drastiques comme l'utilisation d'inactivation thermique à haute température, l'irradiation par UV, rayons X ou micro-ondes. Ces dernières techniques ont toutes pour but de modifier la structure chimique des toxines siège de leur pouvoir toxique.

La combinaison des méthodes physiques et chimiques renforce aussi l'efficacité de chacun des procédés. Ainsi, l'association d'un traitement à l'ammoniaque à un effet thermique et une élévation de la pression décontamine à 80% les fumonisines dans les grains. Cependant, pour les denrées alimentaires destinées à l'alimentation humaine, le règlement européen interdit les décontaminations chimiques.

Method	Aliment	Toxine	Efficacité
NETTOYAGE ET ELIMINATION			
Tri électronique /manuel	Arachide	Aflatoxine	++
Flottation et séparation	Arachide /mais	Aflatoxine	+++
Tamisage	Mais	Fumonisines	+++
Nettoyage et polissage	Blé	Déoxynivalénol	-
Broyage et séparation			
Broyage humide	MAIS	AFLATOXINE ZERALENONE FUMONISINE	+/- +/- ++
Trempage	Mais Blé Mais	Fumonisines Déoxynivalénol Ochratoxine A	++ ++ ++
Broyage a sec	Mais	AFLATOXINE ZERALENONE	+/- +/-
Traitement thermique			
Chaleur humide	Tous les aliments Mais	Aflatoxine Fumonisines	+ou- +ou-
Grillage	Tous les aliments	Aflatoxine	+ou-
Chaleur	Tous les aliments	Trichothécènes	-
Irradiation	Tous les aliments	Aflatoxine	-

+++ : Élimination ou dénaturation à plus de 90 % ; ++ : élimination ou dénaturation comprise entre 70 et 90 % ; + : élimination ou dénaturation comprise entre 50 et 70 % ; - : élimination ou dénaturation inférieure à 50 % ; +/- : élimination dans certaines fractions, mais concentrations dans d'autres ; + ou : élimination modérée, variable selon le traitement effectué.

TABLEAU06 : Efficacité comparée des méthodes physiques de décontamination. (*Revue Méd. Vét.*, 2000, **151**, 12, 1095-1106).

5.2.2.1 Les ligands

a) Les ligands inorganiques :

L'addition d'agents adsorbants inorganiques à l'alimentation animale est la méthode la plus utilisée pour diminuer l'exposition des animaux aux mycotoxines (Guerre 2000). Ce type d'agents permet d'immobiliser certaines mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal, réduisant ainsi leur absorption et leur biodisponibilité dans l'organisme.

- Le charbon actif

Ce ligand est un produit recommandé pour de nombreuses intoxications digestives comme un agent d'adsorption efficace contre les toxines. Les mycotoxines ne semblent pas échapper à la règle puisque des études montrent son efficacité contre les ZEA et/ou les DON. Cependant contrairement à

d'autres ligands (notamment les silicates et les polymères organiques) le charbon actif ne semble pas efficace pour l'adsorption d'autres mycotoxines comme les aflatoxines.

- Les silicates

Cette famille de ligands est composée de plusieurs groupes et de nombreuses dont le chef de file et le plus étudié est le HSCAS (aluminosilicate de sodium calcium hydraté). Cette molécule est caractérisée par son fort potentiel d'adsorption pour les aflatoxines de façon presque spécifique. Cependant c'est un mauvais absorbant pour les autres mycotoxines.

- Les bentonites

Les bentonites constituent l'agent de détoxification des mycotoxines le plus utilisé en alimentation animale. Ce sont des argiles montmorillonite formées par le vieillissement des cendres volcaniques. Elles sont composées d'une microstructure cristalline lamellaire dont la composition et l'adsorption varient du fait de l'interchangeabilité des cations positionnés sur les différentes couches. La capacité à adsorber les mycotoxines n'est pas leur application primaire. Elles sont généralement utilisées en alimentation animale comme agent thérapeutique contre les diarrhées et les inflammations (Petkova *et al.* 1981; Dembinski *et al.* 1985).

- D'autres argiles comme les sépiolites ou les cérites sont peu efficaces pour adsorber les fusariotoxines même *in vitro* (Ramos *et al.* 1996; Galvano *et al.* 1998; Solfrizzo *et al.* 2001).

Les ligands inorganiques, grâce à leur taux d'inclusion élevé, réduisent la biodisponibilité de certaines mycotoxines. Cependant leur efficacité reste restreinte (tableau 2) et leur capacité d'inclusion n'est pas spécifique aux mycotoxines. Ainsi, ces ligands inorganiques peuvent réduire la biodisponibilité de certains minéraux ou de vitamines de la ration. [FANGEAT Loïc 2008].

les absorbants	Les mycotoxines			
	AFB1	ZEA	OTA	T-2
aluminosilicates de sodium calcium hydratés	"+++"			

(HSCAS)				
phyllosilicates (dérivés de zéolites) "+++"	"+++"			
zéolites (aluminosilicates hydratés de cations alcalins)	"+++"	"+++"		
Bentonites	"+++"			
kaolinite, sépiolite et montmorillonite (des argiles)	"++"			
résines (polyvinyl-polypyrrolidexynivalénol (PVPP))			"+++"	

Activité démontrée : "+++ ou "++"

Tableau 07 : Les ligands inorganiques pour la lutte contre les mycotoxines (inspiré de WHITLOW, W. and W.M. HAGLER)[FANGEAT Loïc 2008]

5.2.3 Le traitement biologique

La dégradation microbienne est une option prometteuse pour contrôler les mycotoxines de l'alimentation animale et humaine. Cette biotransformation peut être obtenue par l'utilisation d'enzymes dégradant des mycotoxines, ou des microorganismes produisant de telles enzymes, au cours de fermentations contrôlées, comme l'ensilage pour l'alimentation du bétail. A défaut d'une minéralisation complète, elle doit permettre d'obtenir des métabolites non toxiques ou moins toxiques que les molécules mères. Suivant les toxines, les réactions de biotransformation incluent entre autres des acétylations, des glycosylations, des ouvertures de cycles, des déaminations et des décarboxylations.

Isolement de microorganismes dégradants les mycotoxines.

Des microorganismes d'intérêt peuvent être trouvés dans des collections existantes. Dans un criblage de 202 bactéries fermentaires provenant de diverses collections et initialement isolées de produits laitiers et de matières végétales, Niderkorn *et al.* (2007) ont trouvé huit souches de *Lactobacilli* et trois de *Leuconostoc* capables de bio-transformer le ZEN en α -zéaralénol moins toxique, mais aucune bactérie n'a été détectée pour la biotransformation des

fumonisines. Souvent, les souches capables de métaboliser des mycotoxines ont été trouvées à partir de travaux d'isolement et de sélection dédiés à cet objectif (Tableau 3). A partir de 21 échantillons de sols, Benedetti *et al.* (1996) ont réalisé un mélange des communautés microbiennes extraites de ces sols. Par cultures successives sur un milieu minimum enrichi avec des fumonisines comme seule source de carbone et d'azote, ils ont obtenu un consortium microbien simplifié capable de métaboliser les fumonisines. Ainsi ils ont finalement isolé 30 souches bactériennes dont une seule s'est révélée capable de dégrader entièrement la fumonisine B1 (FB1) après 1 jour d'incubation à 25°C. Elle est très proche phylogénétiquement de *Delftia amylovorens*, mais l'espèce n'a pas pu être déterminée.

L'exploitation de la biotransformation des mycotoxines pour contribuer à garantir la qualité sanitaire des produits alimentaires offre divers avantages comme son efficacité, la spécificité d'action et les possibilités d'application au cours de procédés fermentaires mis en œuvre dans les industries alimentaires.[
[Innovations Agronomiques (2015)]

	Nom	Milieu d'isolement	Activité impliquée	Références bibliographique
Bactéries	NCB1492 (<i>Delftia Comamonas</i>)	Sols	Inconnu	Benedetti <i>et al.</i> 2006
	ATCC 55552 ou 2412.1	Grains de maïs	Décarboxylation - transamination - aminotransferase	Heinl, 2010 - 2011
	Sphingopyxis spp. MTA144	sols	décarboxylation et transamination	Täubel, 2005
	Bacillus spp. S9 S10 S69	Ensilages de maïs	dégradation partielle	Camilo <i>et al.</i> , 2000

Levures	Exophiala spinifera	Différents organes de maïs	Décarboxylation et déamination oxydative	Duvick <i>et al.</i> 1999
	Rhinocladiella atrovirens			

Tableau 08 : Microorganismes connus comme dégradant les Fumonisines et activités impliquées.

Vers le développement de levains dégradant les mycotoxines

Dans une revue sur les bactéries lactiques de levains qui pourraient être utilisées comme agents de contrôle des mycotoxines, Hassan *et al.* (2015) constatent qu'il existe divers exemples de bactéries lactiques issues de différents milieux, mais très peu d'études concernent les bactéries des levains. De plus, la propriété principalement mise en évidence chez ces bactéries est l'adsorption des mycotoxines plutôt qu'une dégradation enzymatique irréversible (Hassan et Bullerman, 2013). Cependant, l'exposé de travaux de recherches récents qui précède a souligné, d'une part, qu'il est possible de trouver dans différents environnements des microorganismes, en particulier des bactéries lactiques et des levures, capables de dégrader les divers mycotoxines que l'on peut rencontrer dans les céréales, et, d'autre part, que la transformation des mycotoxines et l'évolution de leurs teneurs lors des processus fermentaires que sont les ensilages ou la levée de pâtes à pain sont un phénomène complexe et variable qui peut dépendre de la qualité de la matrice, des conditions physico-chimiques de fermentation, et des microorganismes fermentaires présents. Ces facteurs qui affectent le devenir d'une mycotoxine sont également des cibles sur lesquelles nous pouvons agir pour contrôler le phénomène et le diriger dans le sens souhaité, à savoir une diminution des teneurs en mycotoxines. Pour atteindre cet objectif, le passage par plusieurs étapes de recherche et développement est nécessaire.

- 1) la mise en évidence certaine de la dégradation des mycotoxines dans certains échantillons : La qualité de la matrice et les modifications de ses propriétés physicochimiques, apportées par les divers additifs utilisés ou les activités enzymatiques microbiennes, interviennent comme facteurs

de masquage ou de libération de mycotoxines présentes dans les matières premières. Pour pouvoir doser toutes les mycotoxines présentes, qu'elles soient libres, conjuguées ou adsorbées à la matrice, les méthodes standard ne sont pas suffisantes. Des modifications de la matrice (de type hydrolyse) doivent être pratiquées pour libérer les toxines et l'analyse des différentes formes conjuguées doit être réalisée. Une alternative, pour mettre en évidence une activité de transformation d'une mycotoxine, est de caractériser ses métabolites de dégradation, et de pouvoir les doser, s'ils s'accumulent en quantité suffisante.

- 2) L'identification de consortia microbiens ou d'isolats spécifique : associés à l'activité de dégradation : dans les échantillons montrant une réelle dégradation des mycotoxines. Les techniques de séquençage à haut débit permettant d'étudier les aspects taxonomiques et fonctionnels de métagénomes, combinées à des approches d'isolement de microorganismes sélectionnés pour leur activité spécifique, ouvrent de nouvelles perspectives. Il est envisageable d'obtenir des marqueurs moléculaires, fonctionnels ou taxonomiques, permettant de caractériser le potentiel de dégradation d'un levain et de suivre la persistance de ce potentiel au cours du temps. Par ailleurs, si des bactéries lactiques et des levures cultivables actives sont isolées de l'ensilage ayant montré leur activité de dégradation, leur introduction dans des consortia existants, et leur installation, devraient permettre de garantir un potentiel de dégradation des mycotoxines.
- 3) La définition des conditions optimales d'expression des potentiels de dégradation : Température, pH, activité de l'eau et temps nécessaire sont les premiers facteurs à prendre en compte. Les conditions finalement définies resteront bien sûr compatibles avec les exigences de qualité technologique, organoleptique et nutritionnelle du produit fini.
- 4) la nécessité de contrôles toxicologiques : Les produits de dégradation s'accumulant éventuellement à la fin du processus fermentaire se doivent d'être non ou moins toxiques que les mycotoxines initiales.

Le développement de nouveaux levains ou ferments capables de dégrader les mycotoxines pour garantir la qualité sanitaire des produits de boulangerie, ou

d'alimentation animale, n'est envisageable dans un premier temps qu'à travers des études focalisées sur une toxine ou famille de toxines. Mais il est évident qu'à plus long terme, il faudra envisager de pouvoir agir sur plusieurs toxines en parallèle. [*Innovations Agronomiques*, 2015]

Matériels Et Méthodes



PARTIE II : DEMARCHE EXPERIMENTALE

Cette étude a été conduite dans le but d'isoler et d'identifier la microflore fongique qui contamine les aliments de bétail dans la zone étudiée.

1. Analyse mycologique des aliments de bétail

1.1 Prélèvement des échantillons

Afin d'avoir un échantillonnage représentatif, 4 échantillons d'aliments de bétail ont été prélevés au hasard, en respectant certaines précautions d'échantillonnage :

- Prise d'échantillons provenant de la surface, des côtés (endroits plus propices à l'apparition de moisissures), et des couches profondes des lots d'aliment de stockage. Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'instruments stériles.
- Mise de l'échantillon composite dans un contenant (sac en plastique) propre inerte et bien protégé contre la contamination extérieure.
- Respect des règles d'hygiène générale pour la personne effectuant le prélèvement.
- Acheminement rapide des échantillons vers le laboratoire et conservation dans un endroit frais et sec jusqu'à leurs analyses (FAO, 2006).

Les échantillons proviennent de quatre types d'aliments différents (son de blé, pain racis, orge et maïs). La collecte a été effectuée en une seule période (février) durant l'année 2020. L'aliment de pâturage n'a pas été analysé durant ce travail en raison du changement fréquent de l'endroit de pâturage pour les mêmes animaux.

L'échantillonnage a été réalisé auprès de deux fermes traditionnelles, situées dans la région d'Alger.

Tous les échantillons ont été transportés au laboratoire vétérinaire et contrôle de qualité des produits agroalimentaires Baraki Alger.

Au moment de la collecte, aucun échantillon n'a présenté de signes visibles de contamination par les moisissures.

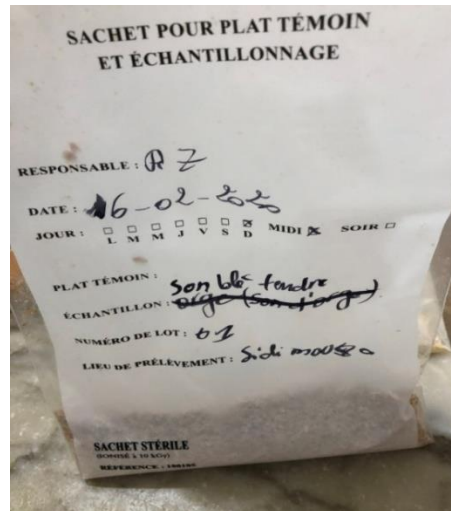
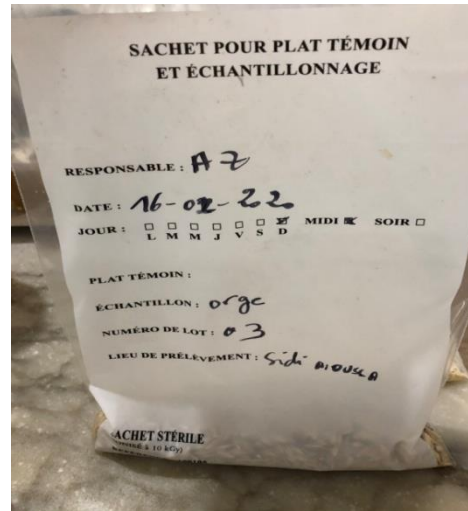
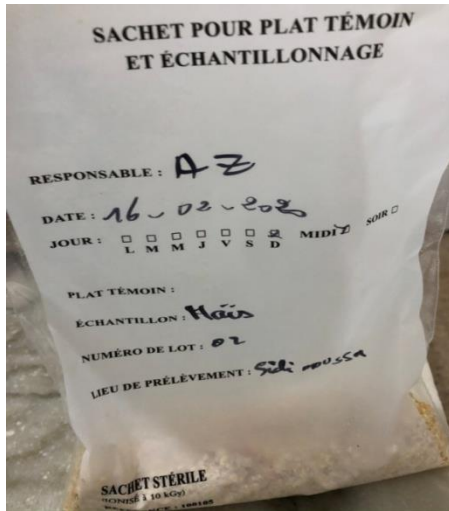


Figure 07: les différents échantillons d'aliments prélevés au niveau des élevages

		élevage 01	élevage 02
Renseignement concernant l'élevage	Nom	A	
	Prénom	Z	
	lieu	Sidi moussa	Larbaa
	Nombre	20	30

Renseignement zooteknique	Moyen d'âge	6 -18 mois	6-18 mois
	Race	Blanche	Blanche
	Type d'élevage	*Bâtiment : Hangar *Abreuvement : *Alimentation : Echantillon 1 : Son de blé tendre Echantillon 2 : Mais Echantillon 3 : Orge *Paramètres d'ambiance : bien aérée Avec une température de 19 c *Densité d'élevage : *Litière : paille *Matériels d'élevage : *L'origine du cheptel :	*Bâtiment : Garage *Abreuvement : *Alimentation : Pain racis / maïs *Paramètres d'ambiance : mauvaise aération *Densité d'élevage : *Litière : \ *Matériels d'élevage : *L'origine du cheptel :
Maladie concernée	Nombre de cas	3	9
	Nombre de mortalité	0	0
	Morbidité	3	9
	Localisation de la lésion	Diarrhée Enterotoxémie Toxémie de gestation	Acidose Gale Toxémie de gestation
	L'âge	8-14 mois	12-16mois
	Le poids	16-22 kg	16-22 kg

TABLEAU 09 : Renseignement concernant les élevages

1.2 Analyse des échantillons

1.2.1 Préparation des suspensions dilutions

Le principe consiste à mettre l'aliment en suspension dans de l'eau stérile puis à incorporer les différentes dilutions de cette suspension dans le milieu d'isolement.

1.2.1.1 Matériel et méthodes

a) Matériel :

-Pipettes a écoulement total, stériles, d'une capacité nominale de 1 ml et graduées en 0,1 ml.

-Etuve.

-Bouteilles pour effectuer des dilutions.

-Poire à pipeter.

-Boites de Petri, stériles, en plastique, de 90 mm a 100 mm de diamètre.

-Microscope, pour distinguer les levures (fond clair, grossissement de x 250 ± x 1000).

b) Méthode :

- La préparation des dilutions s'effectue dans une zone stérile près du bec Bunsen à un rayon de 10cm de celui-ci et qui consiste tout d'abord à ajouter dans chaque bouteille 10g D'aliment à 90ml d'eau stérile, puis agiter pendant quelques minutes, ce qui constitue la dilution 10-1.



Figure 08 : préparation de la suspension



Figure 09: la suspension finale

-On prélève 1ml de la suspension (10-1) à l'aide d'une poire menée d'une pipette graduée stérile et on les transfère dans des boites de pétris.

b.1 Isolement et ensemencement

Le milieu de culture qui a été utilisé dans notre travail c'est le milieu Sabouraud Le pH du milieu a été ajusté à 5,6 et la stérilisation a été effectuée à 120°C pendant 20 minutes. Comme on a détecté aucune altération durant le transport des échantillons vers le laboratoire On n'a pas utilisé d'antibiotique. de plus le milieu est naturellement acide et assure l'inhibition de la croissance de nombreuses bactéries.

L'étude de la flore fongique a été réalisée par la méthode directe. Dans des conditions stériles près du bec Bunsen et à l'aide d'une poire à pipeter, un échantillon de 1ml de chaque suspension dilution a été prélevé et déposé à 3 endroits différents dans une boîte de Pétri.

Le coulage de la culture se fait en ouvrant légèrement les boites de Pétri et en laissant une petite quantité de 10 ml du milieu couvrant la surface de la boîte. Celle-ci doit être refermée aussitôt pour éviter toute contamination. On étale le milieu en remuant horizontalement les boites de telle manière qu'ils soient suffisamment homogénéisés. Sur les boites ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, ainsi la date d'ensemencement.



Figure 10



Figure 11

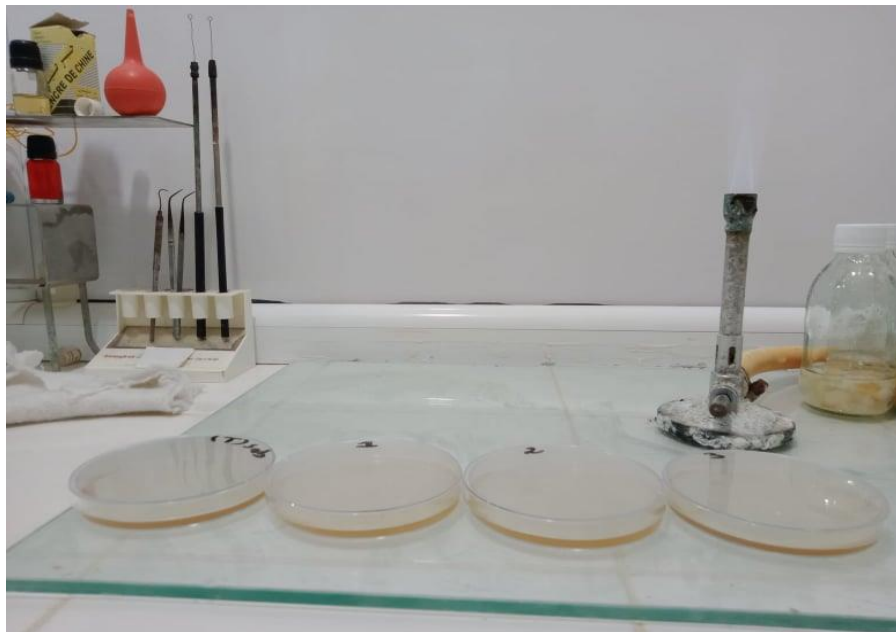


Figure 12

Figures 10, 11,12 : les différentes étapes d'ensemencement

b.2 L'incubation

Les boîtes ensemencées sont portées à l'incubation à l'étuve à une température de 36°C pendant 3 à 6 jours jusqu'à apparition d'un bon développement de moisissures.



Figure 13 : incubation des boites dans une étuve à 36°C

1.2.1.2 Identification de la flore fongique contaminant les aliments de bétail

Ce présent travail est réalisé au niveau de laboratoire vétérinaire et contrôle de qualité des produits agroalimentaires.

Pour des raisons matérielles, l'identification a été très délicate. Dans notre travail nous nous sommes limités à l'identification de quelques espèces.


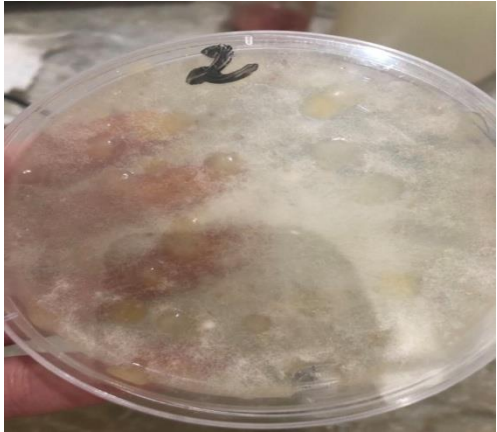
Dans cette partie nous avons procédé à une identification morphologique, basée sur l'aspect macroscopique et l'aspect microscopique des moisissures.

a) L'observation macroscopique

On s'intéresse à l'aspect, la forme, la couleur et la vitesse de croissance des colonies. Ces observations se font à l'œil nu et à la loupe binoculaire.

L'observation a été effectuée en deux temps ; sur une culture jeune d'environ 3 et 4 jours, puis sur une culture de 7 jours pour avoir des structures bien différenciées et caractéristiques de la souche.

Résultats macroscopique de l'analyse mycologique des aliments de bétail :

Boite	Description	Aspect macroscopique
Boite 1	<p><u>Parcelle 1 [Aspergillus] :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Aspect poudreux, velouté de couleur noir - revers jaune - vitesse de croissance : rapide. <p><u>parcelle 2 [mucor] :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Une texture laineuse Blanc beige à brun - Revers : brun - vitesse de croissance : rapide. 	 <p>aspect macroscopique (<i>Aspergillus / mucor</i>) après 4 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon de son de blé tendre.</p>
Boite 2 (Trichoderma)	<ul style="list-style-type: none"> -Un aspect caractéristique d'un enduit pulvérulent Légèrement verdâtre - Revers : incolore - vitesse de croissance : modérer 	 <p>aspect macroscopique (Trichoderma) après 4 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon d'ensilage de maïs</p>
Boite 3 (geotrichum)	<ul style="list-style-type: none"> -Surface duveteuse blanche - Revers : incolore - vitesse de croissance : 	



	<p>Modérée</p>	 <p>aspect macroscopique (geotrichum) après 4 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon d'orge.</p>
<p>Boite 7</p>	<p>Parcelle 1 [Rhizopus] :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une texture cotonneuse - Les colonies blanche au Départ et deviennent grises foncées. - Revers : incolore - vitesse de croissance : rapide. <p>Parcelle 2 [Aspergillus]</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aspect : velouté de couleur noir - revers : jaune - vitesse de croissance : rapide. 	 <p>aspect macroscopique (Aspergillus\Rhizopus) après 4 jours de culture sur milieu Sabouraud, isolé d'un échantillon pain racis/ maïs.</p>

Tableau 10 : Description des résultats macroscopique des analyses mycologiques des aliments.

b) L'observation microscopique

Les observations microscopiques ont été réalisées au grossissement (x40) et (x100). L'identification a été réalisée selon les clés d'identification (P.J Quinn, M.E Carter, B.K Markey, G.R Carter).

Résultats macroscopique de l'analyse mycologique des aliments de bétail :

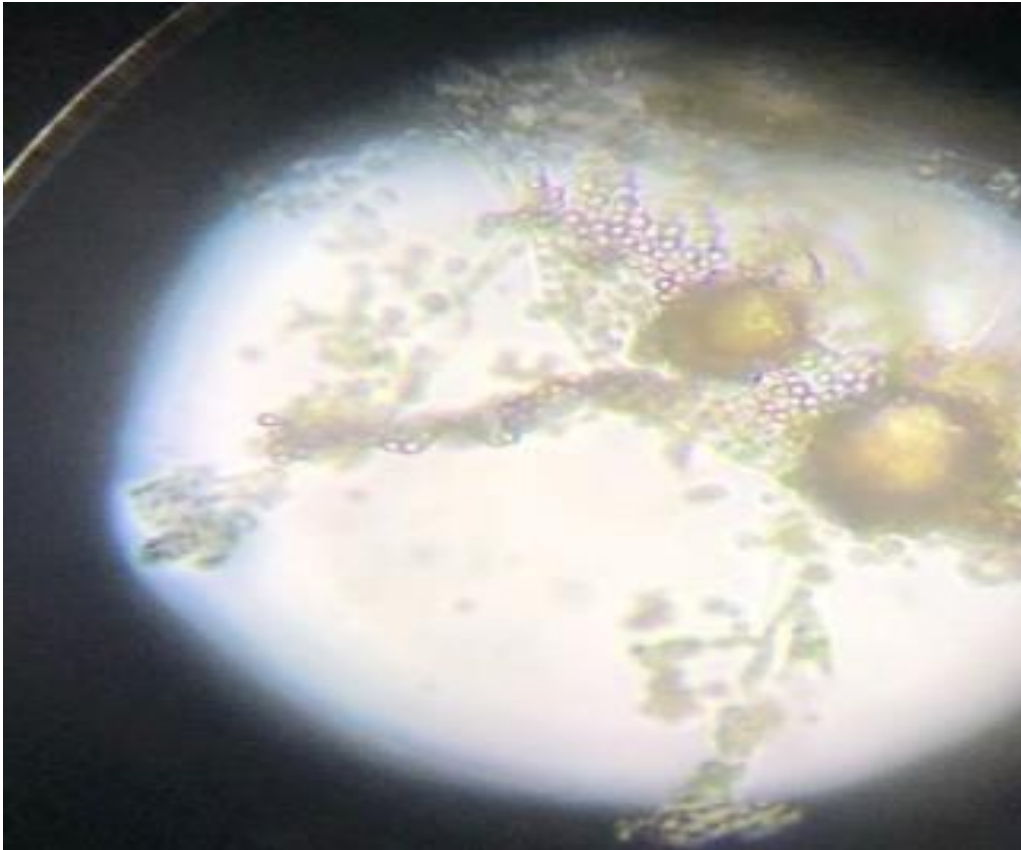


Figure 14 : aspect microscopique (d x40) d'aspergillus après 6 jours de culture sur milieu Sabouraud d'un échantillon de son de blé tendre (boite1).

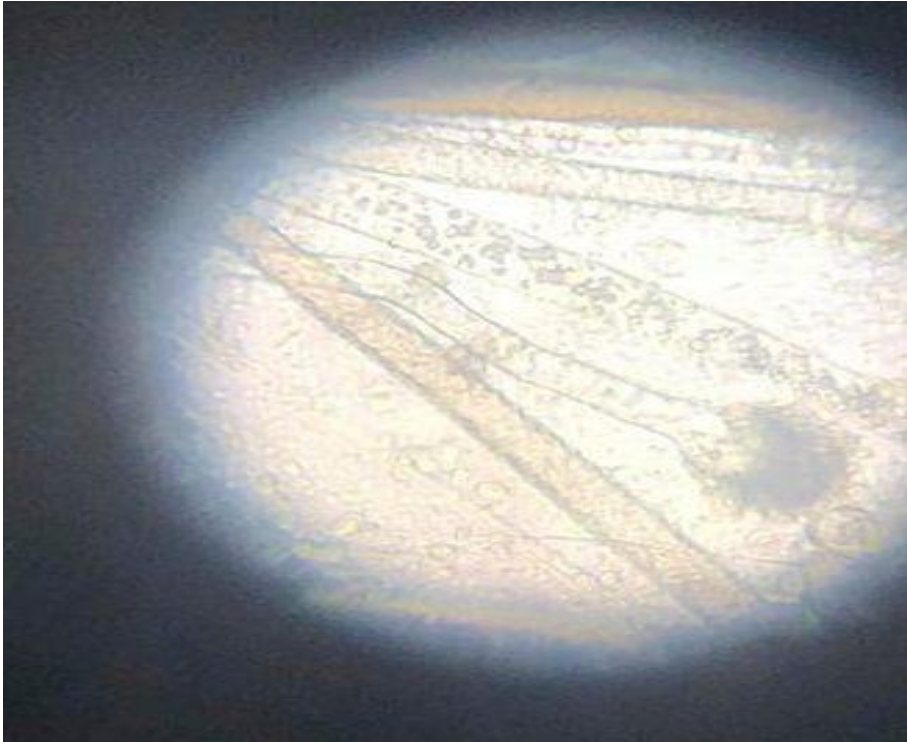


Figure 15 : aspect microscopique d'aspergillus (d x40) après 6 jours de culture d'un échantillon de maïs /pain racis (boite 7).

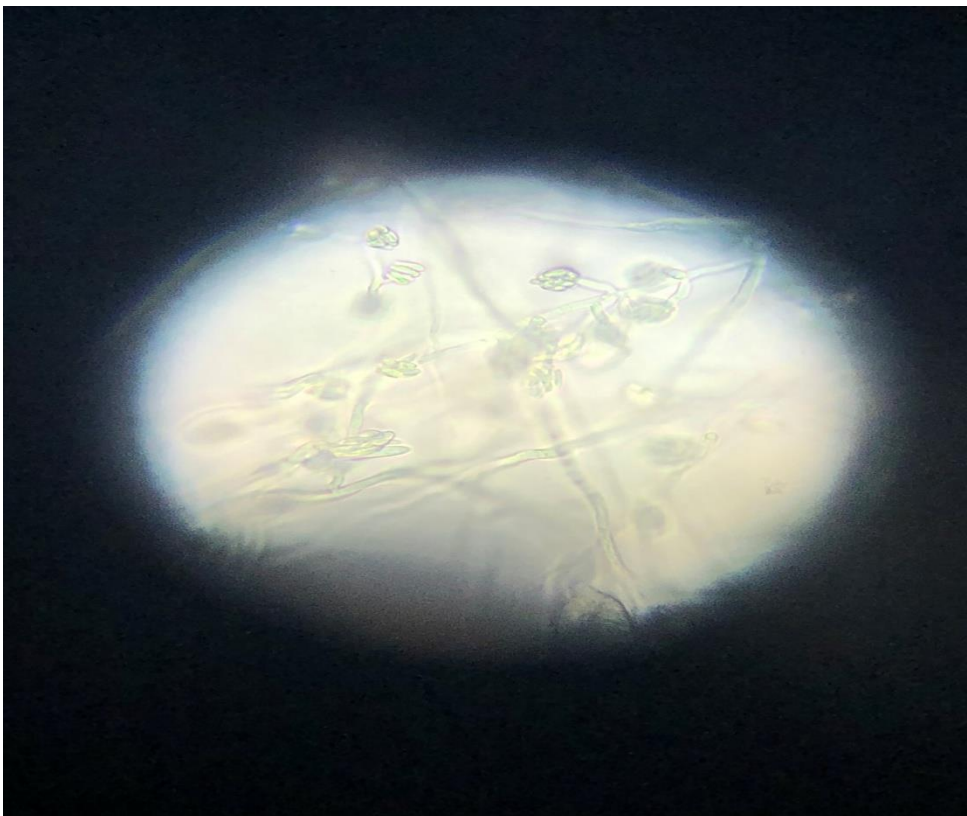


Figure16: aspect microscopique (d x40) de Trichoderma après 6 jours de culture (boite 2) d'un échantillon de maïs.



Figure17 : aspect microscopique (d x40) de mucor après 6 jours de culture sur un milieu Sabouraud (boite1) d'un échantillon de son de blé tendre.

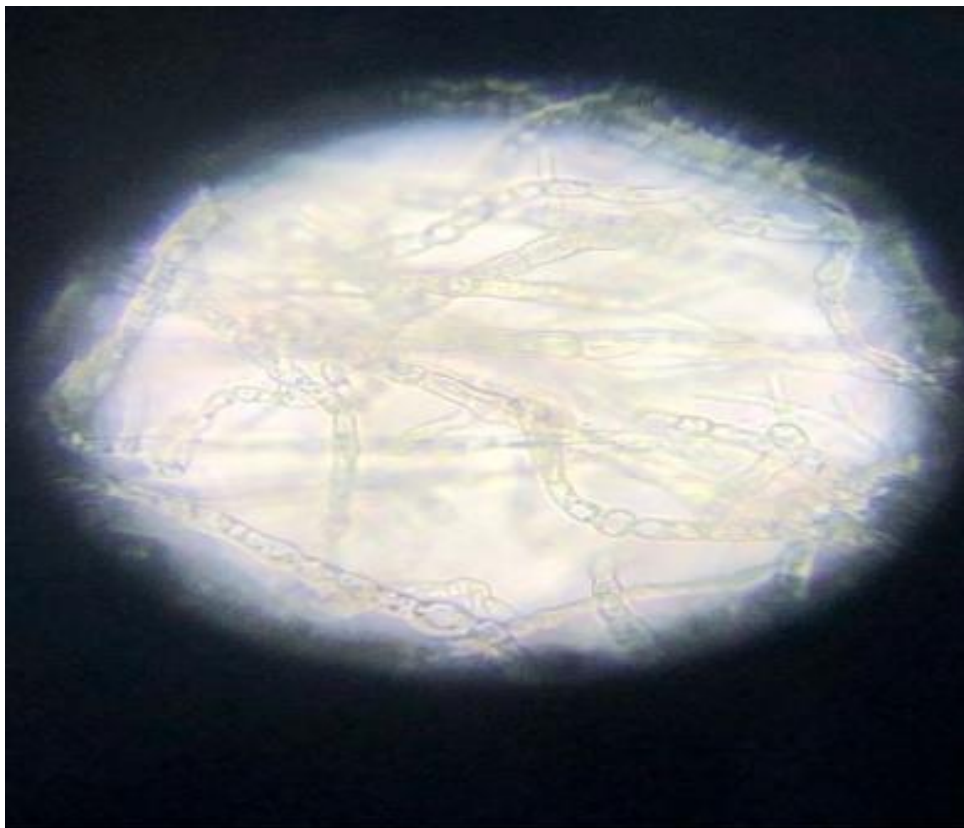


Figure18: aspect microscopique (d x40) de geotrichum après 6 jours de culture (boite3) d'un échantillon d'orge.

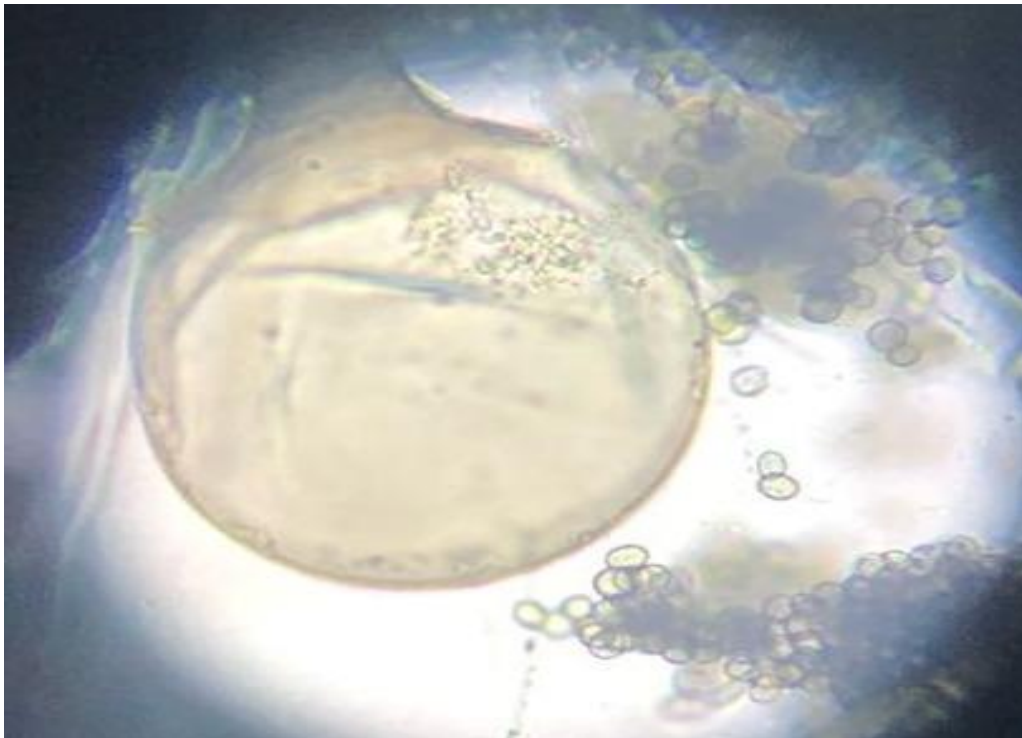
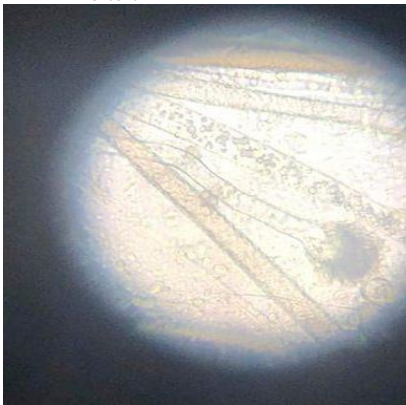
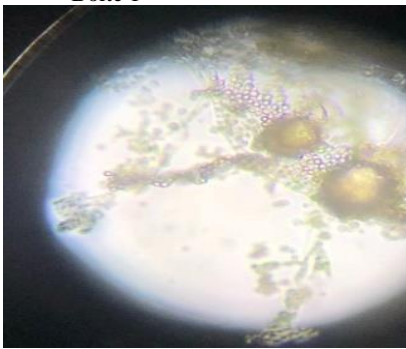
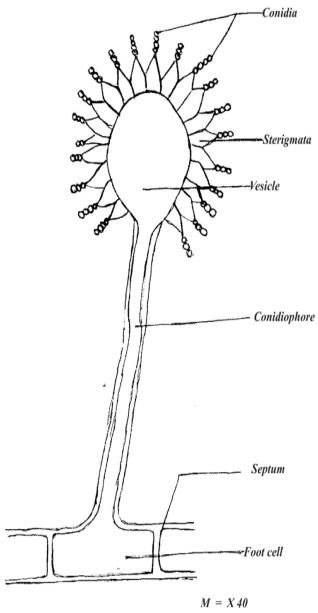
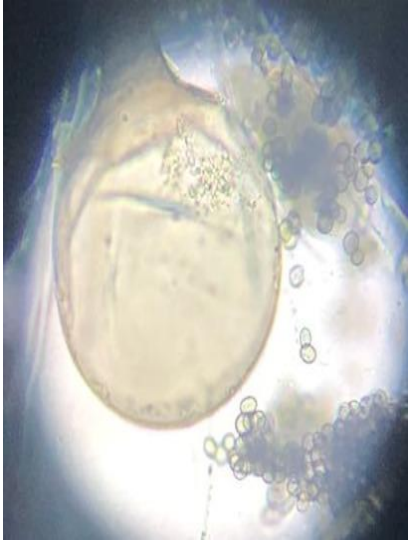
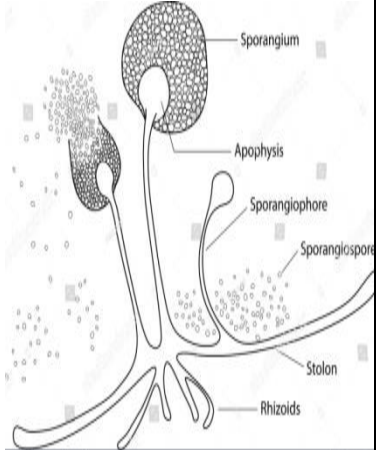




Figure19: aspect microscopique (d x40) de Rhizopus après 6 jours de culture (boite7) d'un échantillon de pain racis/ maïs.

Espèce	Description	Aspect microscopique	Photo référence
Boîte 1 et 7 <i>Aspergillus</i>	<p>-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiospores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules.</p> <p>-Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules.</p> <p>-Têtes conidiennes unisériées ou bisériées;</p> <p>-Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires.</p>	<p>Boîte 7</p>  <p>Boîte 1</p> 	

<p>Boite 7 Le <i>Rhizopus</i></p>	<p>-Le thalle à croissance rapide Sporosystophores généralement très grands, terminés en entonnoir, en bouquet de 2 à 6 présentant à la base de rhizoïdes.</p> <p>-Columelles brunes, globuleuses ou semi globuleuses.</p>		
<p>Boite 2 Trichoderma</p>	<p>-Les hyphes sont septées.</p> <p>-les conidiophores sont ramifiés et peuvent parfois prendre l'aspect de pyramide.</p> <p>-les phialides ont la forme de bouteilles renflées à la base et sont directement insérée sur les condiphores.</p> <p>-les phialades peuvent être isolées ou en groupe (3 le plus souvent).</p>		


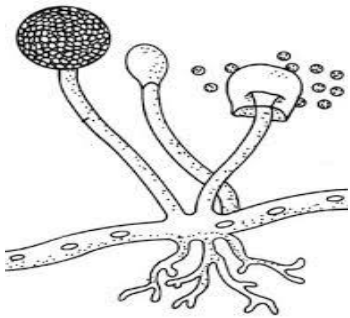

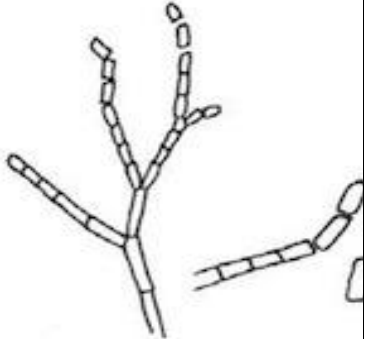
<p>Boite 1 Mucor</p>	<p>-Sporocystes (sporange) bruns -Sporocystophore (sporangioaphore) non ramifié</p> <p>-Columelle (dilatation de la partie apicale du sporocystophore) ovoïde ou cylindrique.</p> <p>-Spore ovoïdes, lisse ou rugueuses.</p>		
<p>Boite 3 Geotrichum</p>	<p>-les myceliums sont organisés en hyphes cloisonnées (dit septées).</p> <p>-Les hyphes se fragmentent pour donner les arthroconidies qui sont des spores asexuées et individuelles.</p> <p>-Les arthroconidies sont de tailles variables et peuvent avoir une forme cylindrique ou de baril.</p>		

Tableau 11 : Description des résultats microscopique des analyses mycologiques des aliments.

2. Discussion

L'isolement a partir de deux fermes traditionnelles, situées dans la région d'Alger a permis l'obtention de 6 isolats fongiques appartenant à 5 genres : Aspergillus, mucor, trichoderma, geotrichum et rhizopus. L'analyse des résultats montre, par ordre décroissant, que le genre majoritaire est Aspergillus avec une fréquence de **33.33%**, suivie des autres genres avec un pourcentage de **16.66 %** pour chacun d'eux.

La fréquence d'isolement (**Fr**), et la densité relative (**Dr**) des espèces ont été calculées selon la méthode de Gonzalez *et al*, (1995) et Kollu *et al*. (2009).

2.1 La fréquence :

$$\text{Fr (\%)} = \frac{\text{Nombre d'échantillons avec une espèce ou d'un genre}}{\text{Nombre totale des échantillons}} \times 100$$

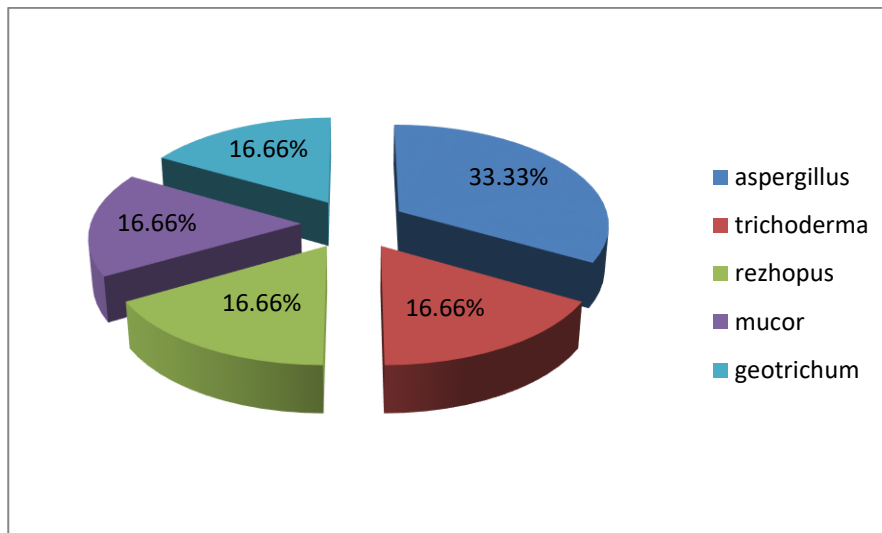


Figure20 : fréquence d'isolement des genres de champignons isolés de l'ensemble des échantillons d'aliments analysés

2.2 La densité relative :

$$\text{Dr (\%)} = \frac{\text{Nombre d'isolats d'une espèce ou d'un genre}}{\text{Nombre total de champignons isolés}} \times 100$$

Boîte	Champignon	Nombre
01	Aspergillus	230
	mucor	70
02	trichoderma	200
03	geotrichum	130
07	Aspergillus	45
	Rhizopus	25

Tableau 12 : Données obtenues après comptage des colonies pour chaque boîte après 3 j d'incubation

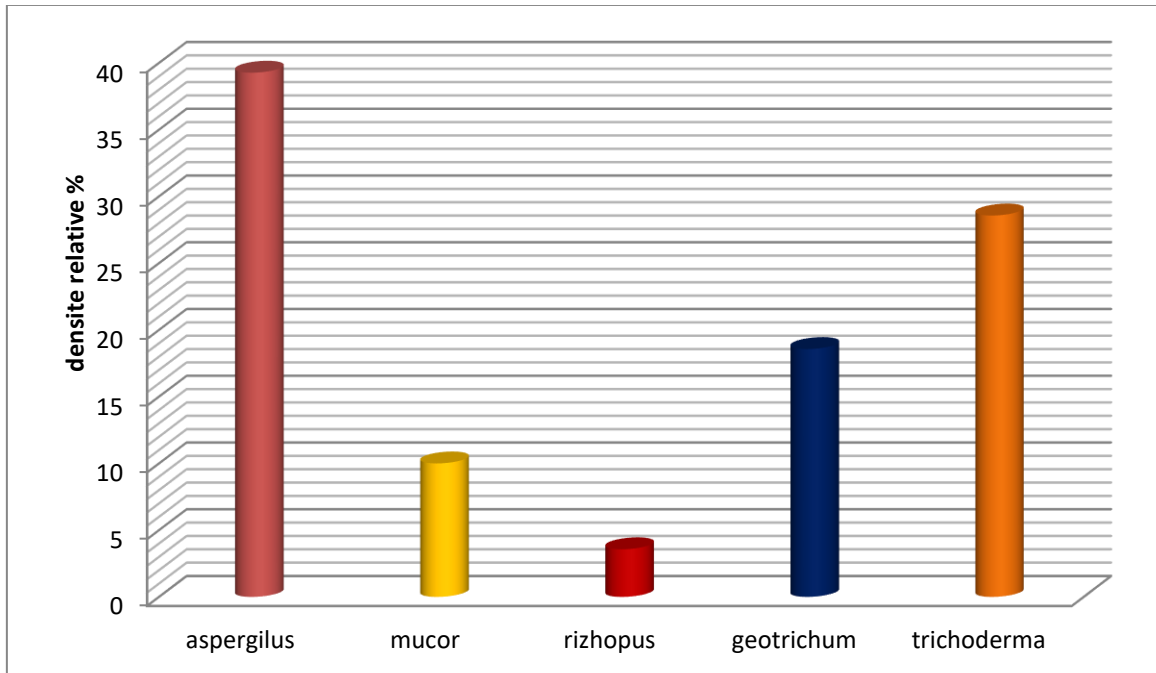


Figure21: densité relative des genres de champignons isolés de l'ensemble des échantillons d'aliments analysés

Nous avons classé les genres isolés selon leur prédominance en :

1. **Genres dominants** : *Aspergillus* (39.27 %), *trichoderma* (28.57%)
2. **Genres moins dominants** : *Mucor* (10 %), *geotrichum* (18, 57%)
3. **Genre minoritaires** : *rizhopus* (5%)

2.3 Pathogénicité des genres rencontrés

La pathogénicité des champignons varie d'une espèce à une autre, ainsi les champignons rencontrés ont été classés selon leur pathogénicité selon une échelle préétablie. Les champignons sont classés comme suit tableau

Genre	Classe	Echelle
<i>Aspergillus</i>	Pathogène	3
<i>Rhizopus</i>	Faiblement pathogène	1
Mucor	Faiblement pathogène	1
Geotrichum	Non pathogène	0
Trichoderma	pathogène	3

Tableau 13 : Echelle de La pathogénicité des champignons.(**ABDELKADER ,2012**)

Selon le tableau (03), on remarque que chaque échantillon a été infectée par un nombre de champignons qui diffère par leur pathogénicité.

- Échantillons 1 et 7 :

La plus grande charge fongique du point de vu qualitatif [39.27%] et quantitatif [33.33%] dans les 2 élevages à été observé avec le genre *Aspergillus* [échantillon 1 : son de blé tendre] et échantillon 7 : [pain rassis / maïs].

Certaines espèces d'*aspergillus* peuvent être pathogènes pour le cheptel en produisant des mycotoxines comme les aflatoxines et l'ochratoxine.

L'un des effets les plus notables d'aflatoxine et l'OTA est la diminution de l'efficacité du système immunitaire .cette immunosuppression entraîne une sensibilité accrue aux maladies et aux infections ce qui peut expliquer la présence quasi permanente dans les 2 élevages de maladies et de symptômes tel que les diarrhées la gale et les entérotoxiémie.

L'aflatoxine et l'OTA peuvent atteindre également l'appareil cardiovasculaire, l'appareil respiratoire et l'appareil digestif dans ce cas les acidoses au niveaux de l'élevage n2 (échantillon 7).

On a pu aussi détecter le genre *mucor* (échantillon 1) et le genre *Rhizopus* (échantillon 7) qui sont généralement peu ou pas pathogènes cependant ils sont en synergie avec le genre *aspergillus* ce que peut entraîner une baisse générale dans les performances zootechniques.

- Échantillon n : 2 (ensilage de maïs)

Pour cet échantillon on a identifié le genre *trichoderma*. Ce champignon dans des conditions favorables produits des trichothécènes. au sein de cette famille les mycotoxines les plus couramment détectés sont Don la T-2 la NIV et la Das. Qui sont remarquablement stables même lorsqu'ils sont conservés longtemps à température ambiante (JECFA 2003).

Tout comme les mycotoxines produites par les *aspergillus* les trichothécènes ont un pouvoir immunosuppresseurs chez les ruminants et laisse place aux maladies opportunistes dans ce cas des, entérotoxiémie et diarrhées.

- Échantillon n : 3 (orge)

Pour l'échantillon n 3 on a identifié un seul genre le *Geotrichum* un genre ou peu d'études sont faites sur ses effets chez les ruminants et qu'on considère non pathogène.

D'après la présente étude, les aliments de bétail analysés, n'ayant présenté aucun signe de contamination fongique apparent, se sont avérés fortement contaminés par divers genres de moisissures mycotoxinogènes. De plus, l'absence de champignons visibles ne signifie pas que les aliments ne contiennent pas des toxines fongiques, qui peuvent persister sur le produit bien après la disparition des moisissures (Fangeat, 2008). Par ailleurs, la contamination des aliments de bétail par des champignons filamenteux microscopiques ne conduit pas nécessairement à la présence de mycotoxines, car l'apparition de mycotoxines dépend de plusieurs facteurs tels que l'humidité relative, la température, la composition du substrat, et le degré de contamination (Joshaghani et al., 2013). Cependant, la formation de mycotoxines est conditionnée au préalable par la croissance du champignon (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). L'identification des moisissures peut être utile pour tenter de déterminer quelles mycotoxines pourraient être présentes.

Conclusion générale

Les mycotoxines sont des composés issus du métabolisme secondaire des moisissures et sont dotées d'un potentiel toxique réel à l'égard des ruminants. Les toxines fongiques se retrouvent à l'état de contaminants naturels dans de nombreuses denrées destinées à l'alimentation animale et humaine telles que les fourrages, les céréales, les abats, les fruits, les légumes, et les produits laitiers. Les familles de mycotoxines considérées comme importantes d'un point de vue alimentaire et sanitaire sont les Aflatoxines, les Fumonisines, les Ochratoxines, les alcaloïdes de l'ergot du seigle, la Zéaralénone, la Patuline et les Trichothécènes. Ces toxines sont essentiellement produites par cinq genres de champignons : *Fusarium*, *Aspergillus*, *Claviceps*, *Alternaria* et *Penicillium*.

De nombreux champignons sont susceptibles de se développer et de sécréter des toxines fongiques, si un certain nombre de conditions sont réunies (conditions météorologiques favorables, composition idéale du milieu de croissance, présence d'insectes et de rongeurs...).

Hormis leur impact économique pour les éleveurs, les agriculteurs et l'industrie agroalimentaire, les mycotoxines représentent un réel danger pour la santé animale et humaine, ils exercent des effets néfastes variés sur les ruminants. Leurs effets sont insidieux et difficilement quantifiables : cancérogenèse (Aflatoxines), hépatotoxicité, néphrotoxicité (Ochratoxines), immunotoxicité (Patuline), hématotoxicité (Trichothécènes), neurotoxicité (Fumonisines), tératogénèse, génotoxicité...

Cependant les ruminants ne sont pas sans défense face à ces toxines fongiques. En effet, la flore ruminale ou encore le foie dégradent une grande partie des mycotoxines. C'est pour cette raison que la toxicité des mycotoxines s'exprime, la plupart du temps, sous une forme chronique dans les élevages bovins, notamment en diminuant les performances zootechniques et le statut immunitaire du troupeau. A cause du manque d'informations précises, les mycotoxines sont rarement mises en cause, par les vétérinaires.

La présence de toxines et de champignons dans les aliments est aléatoire et rend délicate l'évaluation du risque mycotoxique, posant ainsi un problème de

sécurité alimentaire. Devant ce constat, il est nécessaire de mettre en place des moyens de lutte et de prévention tout au long de la chaîne alimentaire, comprenant des stratégies agronomiques (bonnes pratiques culturales, traitements fongicides réfléchis, choix des variétés cultivées...), ainsi que l'amélioration des conditions de récolte, de stockage et de transformation. La prévention passe donc par une sensibilisation des différents acteurs des professions de l'industrie agro-alimentaire (éleveurs, agriculteurs...).

Par ailleurs la mise en place de réglementations mondiales, ainsi que l'amélioration de la compréhension des effets toxiques et des modes d'action des mycotoxines représentent un axe important dans la lutte contre leur prolifération.

Référence bibliographique :

- NGUYEN, 2007, identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse. p14.
- AFSSA, 2006 Agence française de sécurité des aliments évaluation des risques liées à la présence des mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale p10.
- NGUYEN, 2007, identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, P16
- Laurent ALVES de OLIVEIRA, VetAgro Sup, 2012, Alimentation/Médecine des populations mycotoxiques chez les vaches laitières, mesures pratiques de maîtrise et prévention.
- GOLOB .P, 2007, Matériel d'enseignement et d'apprentissage pour l'éducation des populations rurales, contrôle des mycotoxines dans l'alimentation et des céréales fourrages, (En ligne) accès internet : www.fao.org/sd/erp/toolkit (page consulté le
- NGUYEN, 2007, identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, p16.
- FANGEAT, 2008, Thèse mycotoxines de la vache laitière aux produits laitiers Présentée à l'Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie), Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire.
- Alban GAUTHIER, 2016, Thèse, Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé, pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie.
- Alban GAUTHIER, 2016, Thèse, Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé, pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie.

- Alban GAUTHIER, 2016, Thèse, Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé, pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, p 45.
- NGUYEN, 2007, identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, thèse présentée pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, p17.
- AFSSA, 2009, Agence française de sécurité des aliments évaluation des risques liés à la présence des mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale rapport final ,p184.
- FANGEAT, 2008, Thèse mycotoxines de la vache laitière aux produits laitiers Présentée à l'Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie), Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, p38
- FANGEAT, 2008, Thèse mycotoxines de la vache laitière aux produits laitiers Présentée à l'Université Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie), Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, p39.
- RICHARD JL, 2007, Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. Internatl. J. Food Microbial. p119.
- Dany Cinq-Mars, Marie Vachon, Johanne Cameron, 2009 , Mycotoxines chez les ovins pour y voir un peu plus clair ,Centre d'expertise en production ovine du Québec (CEPOQ),p13.
- BOUCON Mathieu, 2016, Les mycotoxines : De la vache laitière aux produits laitier, Campus vétérinaire de Lyon, Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire p 52.
- FANGEAT Loïc, 2008, Les mycotoxines chez les bovins, Thèse Présentée à L'université Claude-Bernard - Lyon I, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p 54.
- FANGEAT Loïc, 2008, Les mycotoxines chez les bovins, Thèse Présentée à L'université Claude-Bernard - Lyon I, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p 57.
- BOUCON Mathieu, 2016, Les mycotoxines de la vache laitière aux produits laitier, Campus vétérinaire de Lyon, Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire p 54.

- A. YIANNIKOURIS, J-P. JOUANY, février 2002, Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal.
- FANGEAT Loïc, 2008, les mycotoxines chez les bovins, thèse Présentée à L'université Claude-Bernard - Lyon I, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p 49.
- Jessica Foraison, 2013, Excrétion urinaire des mycotoxines chez les bovins : Essai d'utilisation d'un test Elisa de détection de la zéaralénone dans les urines ; Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire pp 44 -45.
- FANGEAT Loïc; 2008, les mycotoxines chez les bovins, thèse Présentée à L'universités Claude-Bernard - Lyon I, pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p 62.
- BOUCON Mathieu, 2016, Les mycotoxines : De la vache laitière aux produits laitier, Campus vétérinaire de Lyon, Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, pp 47- 48.
- WHITLOW L, HAGLER WH. November 10-11, 2010, Mycotoxins: managing a unique obstacle to successful dairy production. In: Proceedings Dairy Cattle Nutrition Workshop Grantville PA, pp 53-63.
- FANGEAT Loïc, 2008, Les mycotoxines chez les bovins, Thèse Présentée à L'université Claude-Bernard – Lyon I, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p66.
- FANGEAT Loïc, 2008, les mycotoxines chez les bovins, Thèse Présentée à L'université Claude-Bernard - Lyon i, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, P 64.
- Organisation mondiale de la santé, février 2018, note de sécurité sanitaire des aliments, p3.
- TOR-AGBIDYE J, BLYTHE LL, CRAIG AM, 2001, Correlation of endophyte toxins (ergovaline and lolitrem B) with clinical disease: fescue foot and perennial ryegrass staggers. Vet. Human Toxicol.; 43: 140-146.
- Jessica FORAISON, 2013, Excrétion urinaire des mycotoxines chez les bovins : Essai d'utilisation d'un test Elisa de détection de la zearalenone dans les urines, pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, pp 45-46.

- principales mycotoxines et effets chez les animaux (en ligne) accès internet : pharmtox.free.fr/toxicologie/toxclinique/mycotoxines/myco_fiches.htm#_AFLATOXINES (page consultée 20/03/2020) .
- SCHAUMBERGER.S, 2016, les mycotoxines chez les vaches laitières en 10 leçons, à travers une étude de cas (en ligne) accès internet : www2.biomin.net/fr/blog-posts/les-mycotoxines-chez-les-vaches-laitieres-en-10-lecons-a-travers-une-etude-de-cas/ (page consultée le 21/03/2020).
- P. GUERRE, Principales Mycotoxicoses observées chez les Ruminants (en ligne) accès internet : <file:///C:/Users/Mo%20pc/Desktop/002.html> (page consultée le 21/03/2020).
- Jessica FORAISON, 2013, Excrétion urinaire des mycotoxines chez les bovins : essai d'utilisation d'un test Elisa de détection de la zéaralénone dans les urines ; pour obtenir le grade de docteur vétérinaire
- CHARMLEY, L.L. et Trenholm, H.L. 2000. les mycotoxines agence canadienne d'inspection des aliments. produits animaux. santé des animaux et production. fiche de renseignement.
- H. Boudra 2005, Mycotoxines dans les fourrages, un facteur de stress supplémentaire pour les ruminants, p103.
- Jessica FORAISON, 2013, excrétion urinaire des mycotoxines chez les bovins : essai d'utilisation d'un test Elisa de détection de la zéaralénone dans les urines, pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, p 43.
- BOUCON Mathieu, 2016 les mycotoxines : de la vache laitière aux produits laitier, Campus vétérinaire de Lyon, pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, pp 39-40.
- Boudra;2005 ; Mycotoxines dans les fourrages : un facteur de stress supplémentaire pour les ruminants, pp 105-106.
- Christine BONNAL, 2009, Les méthodes diagnostiques des infections fongiques en réanimation, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Hôpital Bichat Claude Bernard.
- A. YIANNIKOURIS, J-P. JOUANY, février 2002, Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal.
- Loïc; 2008, les mycotoxines chez les bovins, Thèse présentée à L'université CLAUDE-BERNARD - LYON I, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire.

- D. Thevenot, J. Bresciani, T. Roux-Marchand, P. Corvisier, 2016, Connaissance, gestion et maîtrise du risque mycotoxines dans les aliments pour animaux, p1.
- Laurent ALVES de OLIVEIR, VetAgro Sup, 2012, Alimentation/Médecine des populations mycotoxiques chez les vaches laitières, mesures pratiques de maîtrise et prévention.
- Nacera Tazerout, 2016, Détermination des concentrations de déoxynivalénol et Zéaralénone associées à des maladies chez les vaches laitières, en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. SC.) en sciences vétérinaires option sciences cliniques, pp 13.16.
- JEAN MARC FREMY, CAROLE THOMANN, mars2009, Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale, pp 245.247.
- Jessica FORAISON, 2013, Excrétion urinaire des mycotoxines chez les bovins : Essai d'utilisation d'un test Elisa de détection de la zéaralénone dans les urines ; pour obtenir le grade de docteur vétérinaire,p51.57
- Loïc; 2008, les mycotoxines chez les bovins, Thèse présentée à L'université CLAUDE-BERNARD - LYON I, Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, P 103.
- Rachelle EL KHORY, 2017; la lutte biologique contre l'ochratoxine A: utilisation des extraits des plantes médicinales ainsi des souches d'actinobactéries et mise en évidence de leur mode d'action, 56.
- Rachelle EL KHORY, 2017, la lutte biologique contre l'ochratoxine A: utilisation des extraits des plantes médicinales ainsi des souches d'actinobactéries et mise en évidence de leur mode d'action P 60.
- P. GUERRE, 2000, Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination des aliments du bétail par des mycotoxines.
- Loïc; 2008; les mycotoxines chez les bovins, thèse Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p104.
- Loïc, 2008, les mycotoxines chez les bovins, thèse Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE- BERNARD - LYON I pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p104-106

- BOUCON Mathieu, 2016, Les mycotoxines : De la vache laitière aux produits laitier ;campus vétérinaire de Lyon, pour obtenir le grade de docteur vétérinaire p 47.
- Loïc, 2008, les mycotoxines chez les bovins, Thèse présentée à l'Université CLAUDE-BERNARD - LYON I, pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire les ligands inorganique pour lutter contre les mycotoxines, P 106.
- P. GUERRE, 2000, Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination des aliments du bétail par des mycotoxines.
- J.M Savoie, F.R Forget ,C Martinez, 2015 Des microorganismes capables de dégrader les mycotoxines: de nouveaux levains pour garantir la qualité sanitaire d'aliment à base de céréales, p 37.
- Microorganismes connus comme dégradant les Fumonisines et activités impliquées innovation agronomique 2015, p 38.
- J.M Savoie, F.R Forget, C Martinez, 2015, Des microorganismes capables de dégrader les mycotoxines: de nouveaux levains pour garantir la qualité sanitaire d'aliment à base de céréales? revue innovation agronomique, pp 41-43.
- REDOUANE-SALAH, Sara, 2016, Caractérisation mycologique des fourrages pour ruminants et recherche d'Aflatoxine M1 dans le lait cru de vache : étude comparative aux laits pasteurisé et lyophilisé, pour obtenir le diplôme de Doctorat en sciences en biologie, pp 65.66.
- LABIOD Fouzia, CHAIBRAS Sara, 2015, Isolement, identification et activité antibactérienne des moisissures d'un sol forestier à Constantine, en vue de l'obtention du Diplôme de Master Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie, pp 58.59.
- Loïc, 2008, les mycotoxines chez les bovins, thèse Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE- BERNARD - LYON I pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, p89.
- Alban Gauthier, 2016, Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé, thèse pour obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, p116.