

Université de Montréal

# **Détermination des concentrations de déoxynivalénol et zéaralénone associées à des maladies chez les vaches laitières**

Par  
NACERA TAZEROUT

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Août 2016

© Nacera Tazerout, 2016

## Résumé

Au Québec, les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées dans la ration des troupeaux laitiers sont le déoxynivalénol (DON) et la zéaralénone (ZON).

Dans le cadre de notre étude, nous avons deux principaux objectifs. Le premier objectif était de quantifier les mycotoxines DON et ZON chez des vaches laitières naturellement contaminées en évaluant leur présence dans l'aliment, le sérum et l'urine de ces vaches. Le second objectif était de déterminer la mesure dans laquelle ces concentrations de mycotoxines pouvaient être associées à des problèmes de santé, de production et de reproduction chez ces bovins.

L'étude s'est déroulée en deux phases. Lors de la première phase, nous avons recensé 60 troupeaux laitiers dans le but d'identifier leurs niveaux de contamination aux mycotoxines. Dans le cadre de la seconde phase, nous avons sélectionné 15 troupeaux présentant les concentrations sériques de Dé-époxy-déoxynivalénol (DOM-1) les plus basses et 15 troupeaux présentant les concentrations de DOM-1 les plus élevées.

Ce projet nous a permis d'identifier des concentrations de DON et ZON aux niveaux alimentaire et urinaire qui étaient associées à une augmentation des risques de réforme, d'avortement, de baisse de la performance en reproduction, d'hypercétonémie, d'endométrite clinique et de baisse de la production laitière.

Les données ainsi recueillies permettront aux médecins vétérinaires et aux nutritionnistes d'affiner les recommandations qu'ils font aux producteurs laitiers relativement à la gestion des mycotoxines.

**Mots clés :** déoxynivalénol, zéaralénone, vache, aliment, urine, sérum

## **Abstract**

In Quebec, the most common mycotoxins found in the diet of the dairy herd are deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON).

As part of our study, we had two main objectives. The first objective was to quantify DON and ZON mycotoxins in naturally contaminated dairy cows by assessing their presence in the feed, serum and urine of these cows. The second objective was to determine the extent to which these mycotoxin concentrations could be associated with health, production and reproductive problems in these cattle.

The study was conducted in two phases. In the first phase, we carried out 60 dairy herds to identify their levels of mycotoxin contamination. In the second phase, we selected 15 herds with the lowest serum De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1) concentrations and 15 herds with the highest DOM-1 concentrations

This project allowed us to identify concentrations of DON and ZON at the dietary and urinary levels that were associated with increased risks of reform, abortion, decreased reproductive performance, hypercetonemia, clinical endometritis And lower milk production.

The data collected will allow veterinarians and nutritionists to refine their recommendations to dairy producers regarding the management of mycotoxins.

**Keywords:** deoxynivalenol, zearalenone, cow, food, urine, serum

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract .....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des sigles et des abréviations .....	ix
Dédicaces.....	xi
Remerciements.....	xii
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Revue de littérature .....	3
1. Caractéristiques des mycotoxines .....	3
1.1 Définition des mycotoxines.....	3
1.2 Historique et découverte des mycotoxines .....	6
1.3 Les conditions favorables au développement des mycotoxines .....	7
1.4 La toxicité des mycotoxines et leurs effets sur la santé des animaux.....	9
1.4.1 Toxicité aiguë.....	12
1.4.2 Toxicité chronique.....	12
2. Diagnostic des mycotoxines chez les ruminants .....	13
2.1 Diagnostic clinique .....	13
2.2 Diagnostic de laboratoire.....	14
2.2.1 L'échantillonnage : .....	14
2.2.2 Les différentes méthodes d'analyse : .....	14
2.2.2.1 La méthode ELIZA .....	15
2.2.2.2 La chromatographique .....	16
3. Métabolisme des mycotoxines chez les ruminants.....	19
4. Impacts économiques des mycotoxines.....	19

4.1 Impact économique sur les cultures.....	19
4.2 Impact économique sur la santé et la reproduction des animaux .....	20
5. Les mycotoxines rencontrées dans l'alimentation des bovins laitiers au Québec .....	21
5.1 Le déoxynivalénol (DON).....	21
5.1.1 Propriétés physico-chimiques du DON : .....	21
5.1.2 Le DON et ses métabolites : .....	22
5.1.3 Les Effets du DON au niveau cellulaire.....	23
5.1.3.1 Effet moléculaire .....	23
5.1.3.1 Effet immunitaire.....	24
5.1.4 Voies d'excrétion et d'élimination de DON: .....	24
5.1.4.1 Voie fécale et urinaire: .....	24
5.1.4.2 Voie lactée : .....	25
5.1.5 Effets de DON sur la santé des bovins laitiers :.....	25
5.2 La zéaralénone (ZON).....	26
5.2.1 Propriétés physico-chimiques de la ZON : .....	26
5.2.2 La ZON et ses métabolites :.....	27
5.2.3 Les Effets de la ZON au niveau cellulaire .....	27
5.2.4 Voies d'excrétion et d'élimination de ZON: .....	28
5.2.4.1 Voie urinaire : .....	28
5.2.4.2 Voie biliaire : .....	29
5.2.4.3 Voie lactée : .....	29
5.2.5 Effets de la ZON sur la santé des bovins laitiers : .....	30
6. Les concentrations de toxicité du DON et de la ZON .....	30
6.1 Seuils du DON.....	31
6.2 Seuils de la ZON .....	31
7. Les facteurs influençant les seuils .....	31
7.1 Le stade physiologique.....	32
7.2 La synergie entre les mycotoxines.....	32
7.3 La flore ruminale .....	33
8. Problématique .....	34

9. Objectifs de recherche.....	35
Chapitre 2 : Article .....	36
Résumé .....	37
Abstract .....	38
Introduction.....	39
Matériels et méthodes .....	40
1. Sélection des troupeaux et récolte des échantillons .....	40
2. Analyse des mycotoxines et de leurs métabolites .....	42
3. Analyses statistiques .....	44
Résultats .....	45
Discussion .....	52
Conclusion .....	57
Remerciements.....	57
Listes des références .....	58
Discussion générale .....	62
Conclusion générale.....	68
Références bibliographiques .....	69

# Liste des tableaux

## Revue de littérature

**Tableau I** : Principaux champignons et mycotoxines d'importance internationale étant responsables de toxicité avérée chez l'homme et l'animal. Adapté de Yiannikouris et Jouany (2002). .....5

**Tableau II** : Prévalence des mycotoxines dans le monde entre 2005 et 2012. Données issues d'analyses de 19 000 échantillons (céréales et produits transformés destinés à l'alimentation animale) Adapté de Global occurrence of mycotoxins in the food and feedchain: Facts and figures. World Mycotoxin Journal, 2013. 6(3): p. 213-222. ....6

**Tableau III** : Principales mycotoxines, le type de grain affecté et leurs effets néfastes sur la santé humaine et animale... ..... 11

**Tableau IV** : Les avantages et les inconvénients de la méthode immuno-enzymatique ou ELIZA et de la méthode physico-chimique ou chromatographique. .... 18

## Article

**Tableau I** : Résultats des analyses univariées sur les différentes concentrations retenues qui ont été déterminées sur la base du seuil ayant la plus grande somme de sensibilité et de spécificité pour prédire l'association avec l'avortement, l'endométrite clinique, l'hypercétonémie et la réforme. .... 47

**Tableau II** : Résultats des analyses multivariées finales visant à prédire l'association avec l'avortement, l'endométrite clinique, l'hypercétonémie et la réforme. .... 48

**Tableau III** : Résultat d'analyse univariée sur la concentration retenue d'après le seuil de la plus grande somme de sensibilité et de spécificité en vue de prédire une association d'une baisse de performance en reproduction. .... 50

**Tableau IV** : Résultat d'analyse multivariée finale visant à prédire la baisse de reproduction des vaches laitières. .... 50

# Liste des figures

## Revue de littérature

**Figure 1** : Structure chimique du déoxynivalenol (DON)..... 22

**Figure 2** : Structure chimique de la zéaralénone (ZON). ..... 27

## Article

**Figure 1** : Histogramme de répartition du pourcentage d'avortement (A), d'endométrite clinique (B), de réforme (C) et d'hypercétonémie(D) chez les vaches laitières consommant une ration naturellement contaminée avec du DON et de la ZON. .... 49

**Figure 2** : Courbe de survie affichée sous la forme d'un graphique de Kaplan-Meier – Temps jusqu'à la gestation pour des groupes de vaches ayant différentes concentrations de ZON dans leur urine (0 bleu : < 2,70 ppb; 1 rouge : ≥ 2,70 ppb)..... 51



## Liste des sigles et des abréviations

ACIA :	Agence Canadienne d'Inspection des Aliments
AF :	Aflatoxine B1, B2, G1, G2, M1
Afssa :	Agence Française de sécurité sanitaire des aliments
ARN :	L'acide ribonucléique
$a_w$ :	Activity of water
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CIRC :	Centre international de recherche sur le cancer
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
DAS :	Diacétoxyscirpénol
DOM-1 :	Dé-époxy-déoxynivalénol
DON :	Déoxynivalénol
ELISA :	Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FB :	Fumonisine B1, B2, B3, B4
FDA :	Food and Drug Administration, Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GIEC :	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
HPLC :	High performance liquid chromatography, Chromatographie liquide haute performance
HT-2 :	Toxine HT-2
IARC :	International Agency for Research on Cancer
JECFA :	Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires
MS :	Matière sèche
MS :	Spectrométrie de masse
NIV :	Nivalénol
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé

OT : Ochratoxine A, B, C,  $\alpha$   
P : Penicillium  
PAT : Patuline  
ppb : Partie par billion  
ppm : Partie par million  
ppt : Part per trillion ( $10^{-12}$ )  
T-2 : Toxine T-2  
ZON : Zéaralénone  
 $\alpha$ -ZOL :  $\alpha$ -Zéaralénol  
 $\beta$ -ZOL :  $\beta$ -Zéaralénol.

## Dédicaces

À la mémoire de mon défunt père Hacène Tazerout, un homme de connaissance et un grand esprit. C'est un pilier qui m'inspire continuellement et grâce auquel il m'a été possible de réaliser cet humble travail. Il est toujours présent dans mon cœur et mon esprit. Que Dieu, le miséricordieux, l'accueille en son vaste paradis.

Je dédie également ce travail à ma très chère mère Mina Ould-Said Tazerout, en témoignage de mon profond amour. Grande dame qui n'a cessé de me prodiguer amour, conseils et encouragements. Son affection, sa bonté, sa bénédiction ainsi que son soutien inconditionnel ont été un moteur pour mener à bien mes études. Je suis consciente de tous les sacrifices auxquels elle a consenti pour parfaire mon éducation et assurer mon bien-être. Je lui exprime toute ma gratitude et mon amour.

À mon très cher frère Kacem et à son épouse Dalila ainsi qu'à mon adorable sœur Rosa et son époux Mourad. Je vous dédie ce travail en témoignage de toute l'affection que je vous porte et de l'attachement qui nous unit.

À mes cinq poupées, Lisa, Sarah, Sofia, Asma et Sabine, pour leur affection.

À toute ma grande famille ainsi qu'à tous mes amis.

## Remerciements

Au terme de cette maîtrise, j'adresse mes plus vifs remerciements :

À mon directeur de recherche Dr Jocelyn Dubuc pour m'avoir offert l'opportunité de poursuivre mes études et pour m'avoir soutenue tout au long de ces trois années. Votre patience, votre soutien pédagogique, votre disponibilité, vos encouragements et vos qualités humaines m'ont profondément touchée. Je vous exprime ma profonde gratitude, merci infiniment.

À mon codirecteur, Dr Younès Chorfi pour votre grande disponibilité, vous m'avez fait partager votre passion pour les mycotoxines. Vos connaissances, votre expérience et votre intérêt pour la recherche ont été pour moi une source de savoir. Je tiens aussi à vous témoigner toute ma gratitude pour votre encadrement et votre investissement dans ce travail.

Mes remerciements vont également au Dre Julie Arsenault et au Dr Simon Dufour pour leurs enseignements, leur disponibilité, leurs encouragements et leurs précieux conseils. Je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens à exprimer mes remerciements à chacun des membres du Comité-conseil pour leurs judicieuses orientations et recommandations.

Aux membres du jury qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail.

À Mme Marie-Claude Gendron et M. Jean-Philippe Pelletier pour leur efficacité et leur soutien technique.

Je remercie également le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation de Québec ainsi que le Programme de Soutien à l'Innovation en Agroalimentaire pour le financement de ce projet.

Aux producteurs laitiers de la clinique ambulatoire bovine qui ont accepté de participer à cette étude, laquelle aurait été impossible sans leur aide.

À ma famille et mes amis, particulièrement Karima Ould-said, Karima Tazerout, Naima Yacef Mokhbi, Said Mokhbi, Sonia Gasmi et Yasmine Khelil pour leur aide, leurs encouragements et leur soutien tout au long de ma maîtrise.

## **Introduction générale**

À l'heure actuelle, les maladies d'origine alimentaire constituent l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. L'ensemble de ces problèmes a sensibilisé la filière agroalimentaire aux risques infectieux et toxiques dans l'alimentation animale et humaine, étant donné que leurs répercussions sur la santé et sur l'économie mondiale sont largement reconnues (Wu, 2006). Cependant, le risque mycosique et plus particulièrement le développement de moisissures dans les aliments sont moins connus du public (Pestka et coll., 2008). Les moisissures présentent pourtant un réel danger pour la santé animale et humaine. En effet, au cours de leur prolifération sur ou dans les aliments, elles sécrètent des substances hautement toxiques appelées mycotoxines (Afssa, 2009). Leur présence est mal connue, tout particulièrement dans le domaine de la production bovine. Les preuves scientifiques sont effectivement assez limitées pour tout ce qui a trait aux effets négatifs de l'ingestion de mycotoxines sur l'état de santé des bovins et sur les performances en matière de production et de reproduction. Elles le sont tout autant quant à l'impact économique que ces moisissures peuvent avoir sur les élevages des ruminants (Whitlow et Hagler, 2008).

L'effet des mycotoxines dépend de plusieurs facteurs, parmi lesquels ceux qui sont liés à la toxine elle-même (le type et la proportion de mycotoxines ingérées ainsi que la durée de la période d'intoxication), ceux qui sont liés à l'alimentation (le niveau de contamination, la composition de l'alimentation), ceux qui sont liés aux animaux (l'espèce, le sexe, l'âge, la race, le niveau de consommation d'aliments, la santé générale, le statut immunitaire, les stratégies nutritionnelles) et, enfin, ceux qui sont liés à la gestion des exploitations agricoles (Bennett et Klich, 2003, Gallo et coll., 2015). Le plus souvent, on impute aux mycotoxines une diminution de l'efficacité du système immunitaire, une sensibilité accrue aux maladies et aux infections, ainsi que des problèmes de reproduction et une baisse générale des performances zootechniques (Diaz, 2005).

Dans les régions à climats tempérés telles que le Canada, les mycotoxines les plus préoccupantes sont les trichothécènes, la zéaralénone (ZON), les ochratoxines, les fumonisines et l'ergot. La question que l'on se pose aujourd'hui est comment peut-on détecter et limiter les impacts négatifs des mycotoxines au Québec et comment atténuer leurs conséquences sur l'économie du pays et sur la santé des animaux ?

Ce mémoire s'intéresse plus exactement à deux mycotoxines, le déoxynivalénol (DON) et la zéaralénone (ZON) ainsi qu'à leurs impacts sur les élevages de vaches laitières. Dans un premier temps, il s'agit d'établir l'état des connaissances actuelles sur les mycotoxines en mettant l'emphase sur le DON et la ZON et examiner leurs métabolismes et leurs conséquences néfastes sur les bovins laitiers. Dans un second temps, la partie expérimentale consiste à quantifier les concentrations de DON et ZON aux niveaux alimentaires, urinaires et sériques à l'aide des nouvelles méthodes chromatographiques et à identifier les seuils d'ingestion associés à des maladies subséquentes chez les vaches laitières.

# Chapitre 1 : Revue de littérature

Il existe actuellement une littérature considérable portant sur le sujet des mycotoxines en alimentation animale. Par le fait, cette littérature décrit les mycotoxines sur les plans chimique et métabolique et traite de la prévention au niveau des récoltes et chez les animaux. Or, malgré ce foisonnement d'informations, la problématique des mycotoxines demeure mal comprise en raison de sa complexité et certaines questions restent en suspens, notamment chez les bovins.

Cette revue de littérature n'est pas faite dans un but de décrire extensivement tout ce qui est connu sur les mycotoxines, mais elle est plutôt faite dans un esprit critique afin de mettre en perspective les aspects connus et ceux que la recherche n'a pas encore su expliquer complètement. En effet, le but de cette revue est dans l'ultime dessein de mieux identifier les opportunités de recherches futures.

## 1. Caractéristiques des mycotoxines

### 1.1 Définition des mycotoxines

Le terme mycotoxine est tiré du grec «mycos» qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison. Les mycotoxines sont des substances chimiques toxiques issues du métabolisme secondaire de certaines moisissures telles que les champignons du genre *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*. Les mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, les trichothécènes, la ZON et la patuline (voir le tableau 1).

Les mycotoxines se développent sur une large variété de denrées alimentaires (Yiannikouris et Jouany, 2002) et peuvent proliférer tout autant avant ou après la récolte que pendant l'entreposage, le transport, la transformation ou l'alimentation des animaux (Whitlow et Hagler, 2008). Ce sont donc des contaminants naturels des aliments (Afssa, 2009). En 1985, La Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) a estimé qu'environ 25 % des récoltes auraient été contaminées par des mycotoxines (Brochard et Le Bacle, 2009). Parallèlement, Pittet (1998) a constaté la présence de mycotoxines dans 40 % des 25 000

échantillons d'aliments prélevés dans 30 pays à travers le monde. Leurs synthèses dépendent de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que l'espèce, la température, le type de culture, le climat et les pratiques agricoles. De ce fait, leurs prévalences varient d'un pays à l'autre (voir le tableau 2).

À ce jour, on a dénombré entre 200 000 et 300 000 espèces de moisissures, mais seulement 200 à 300 toxines sont connues (Hussein et Brasel, 2001). Par ailleurs, on impute à environ 30 d'entre elles des problèmes en matière de santé animale et humaine (Brochard et Le Bacle, 2009). En revanche, il faut garder en mémoire que les moisissures ne sont pas toutes toxiques. Certaines variétés sont d'ailleurs utilisées dans l'industrie agro-alimentaire, à l'exemple de la fromagerie qui en fait usage pour la fabrication du Roquefort ou de la salaisonnerie, entre autres.



**Tableau I :** Principaux champignons et mycotoxines d'importance internationale étant responsables de toxicité avérée chez l'homme et l'animal. Adapté de Yiannikouris et Jouany (2002).

Lieu de développement	Champignons	Mycotoxines
Durant le stockage	<i>Penicillium expansum</i> <i>P. Urticae</i> <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssochlamysnivea</i>	Patuline
	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus clavatus</i>	Ochratoxine A
	<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nominus</i>	Aflatoxines B1, B2, G1, G2
	<i>Claviceps purpurea</i>	Ergolines
Dans les champs	<i>Fusarium sporotrichioides</i> <i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. poae</i> <i>F. roseum</i> <i>F. tricinctum</i> <i>F. acuminatum</i>	Trichothécènes (DON)
Dans les champs	<i>Fusariummoniliforme</i> <i>F. proliferatum</i>	Fumonisines B1, B2, B3
Dans les champs	<i>Fusarium graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>	ZON

F : *Fusarium*, A : *aspergillus*, DON : déoxynivalénol, ZON : zéaralénone.

**Tableau II :** Prévalence des mycotoxines dans le monde entre 2005 et 2012. Données issues d'analyses de 19 000 échantillons (céréales et produits transformés destinés à l'alimentation animale) Adapté de Global occurrence of mycotoxins in the food and feedchain: Facts and figures. World Mycotoxin Journal, 2013. 6(3): p. 213-222.

<b>Mycotoxine</b>	<b>AF</b>	<b>ZON</b>	<b>DON</b>	<b>Fumonisines</b>	<b>Ochratoxines</b>
<b>Amérique du Nord</b>	19%	37%	68%	48%	20%
<b>Amérique du Sud</b>	20%	38%	16%	77%	10%
<b>Europe Septentrionale</b>	ND	22%	64%	ND	ND
<b>Europe Centrale</b>	19%	26%	58%	51%	29%
<b>Europe Méridionale</b>	34%	21%	51%	70%	46%
<b>Europe Orientale</b>	8%	13%	33%	33%	49%
<b>Moyen-Orient</b>	14%	15%	34%	51%	35%
<b>Afrique</b>	40%	28%	66%	72%	36%
<b>Asie du Nord</b>	13%	56%	78%	54%	23%
<b>Asie du Sud</b>	78%	25%	21%	52%	55%
<b>Asie du Sud-Est</b>	55%	37%	29%	56%	27%

AF : Aflatoxine, ZON : Zéaralénone, DON : Déoxynivalénol, ND : information non disponible.

## 1.2 Historique et découverte des mycotoxines

La contamination des aliments par des substances toxiques produites par des champignons est un phénomène connu de longue date. L'ergotisme également dénommé «feu sacré» dont l'agent causal est *Claviceps purpurea* est la plus ancienne mycotoxicose historiquement reconnue. Elle a sévi du Moyen-Âge au XVIII<sup>e</sup>siècle en Europe occidentale et en Europe centrale (Jouany et coll., 2009). En 1960, plus de 100 000 dindons sont morts en l'espace de quelques mois au Royaume-Uni, du fait d'une maladie dénommée la «maladie de la dinde» attribuée à une contamination de farine d'arachides importée du Brésil (Fink-Grenmels, 1999). Des chercheurs ont réussi à reproduire la maladie en administrant la même

alimentation à des oiseaux. Il a été confirmé que la maladie était d'origine fongique et que le champignon producteur de la toxine était *Aspergillus flavus* (Nesbitt et coll., 1962), d'où le nom attribué à la toxine, à savoir aflatoxine (Jouany et coll., 2009).

On a longtemps confiné les mycotoxines aux pathologies provoquées par l'ergot de seigle, mais depuis les années 1960, grâce à la découverte de l'aflatoxine, la question des mycotoxines a pris une importance considérable. Depuis ce jour, la liste des moisissures considérées comme étant aptes à produire des toxines ne cesse de s'allonger. À titre d'exemple, il faut savoir que les fumonisines n'ont été identifiées qu'en 1988, quoique la mycotoxicose qu'elles provoquent chez les équidés soit connue depuis le début du siècle (Gelderblom et coll., 1988, Marasas et coll., 1988).

### **1.3 Les conditions favorables au développement des mycotoxines**

La mycotoxinogénèse est fortement influencée par l'interaction complexe de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques (Magan et Aldred, 2007).

- Les facteurs intrinsèques : Ils sont liés à la souche fongique elle-même. Certaines moisissures sont toxigènes, mais d'autres ne le sont pas et certaines espèces peuvent produire plusieurs mycotoxines, à l'instar de *Aspergillus flavus* qui peut produire des aflatoxines, de l'acide cyclopiazonique et de l'aspertoxine (Fitzgerald et coll., 1998).
- Facteurs extrinsèques : Facteurs de l'environnement contribuant à la croissance des moisissures, tels que la teneur en eau, l'humidité relative, le pH, la température ambiante, la composition du substrat en éléments nutritifs et sa richesse en graisse ou en azote.
  - a. Substrat : Les moisissures sont des organismes hétérotrophes se développant exclusivement sur des substrats nutritifs, à l'exemple du saccharose et des acides aminés contenus dans les produits alimentaires de base. Pour utiliser ces substrats, il faut pouvoir les atteindre ; une rupture préalable des défenses naturelles des

grains et des fruits est donc nécessaire pour permettre une pénétration et un développement rapide des moisissures (Vogelgsang et coll., 2008).

- b. Activité de l'eau ou la disponibilité en eau ( $a_w$ ) : L'activité de l'eau équivaut au ratio entre la quantité d'eau contenue dans une substance et la quantité d'eau totale que celle-ci est susceptible de contenir. Elle est définie par l'équation :  $a_w = p / p_0$ , où  $p$  = la pression partielle de vapeur d'eau dans une substance au-dessus de la surface de celui-ci et  $p_0$  = la pression partielle de vapeur saturée de l'eau pure à la même température (Brochard et Le Bacle, 2009). L'exigence des moisissures vis-à-vis de l'eau est variable selon l'espèce et la souche (Beuchat, 1983). En règle générale, la plupart des moisissures sont plus à même de se développer lorsque l' $a_w$  se situe entre 0,85 et 0,99. Ainsi, les *Aspergillus* prolifèrent mieux à une  $a_w$  comprise entre 0,72 et 0,80, selon les souches. Une  $a_w$  comprise entre 0,80 et 0,90 contribue au développement des *Penicillium* et une  $a_w$  comprise entre 0,80 et 0,92, à celle des *Fusarium* (Marin et coll., 1995, Pardo et coll., 2005). Une eau à l'activité plus élevée accroît la quantité d'eau libérée et ce phénomène concourt au développement des micro-organismes.
- c. La température : La température optimale pour la croissance des moisissures se situe habituellement entre 10 et 30 °C (Ribeiro et coll., 2006), mais cette marge peut s'étendre de 0 à 60 °C. Ainsi, certaines espèces thermophiles peuvent croître à des températures avoisinant les 55 °C (à l'exemple de l'*A. fumigatus*) et le *Cladosporium herbarum* peut même proliférer à des températures inférieures à 0 °C (Magan et Lacey, 1984). Les *Aspergillus* se développent préférentiellement sous des climats tropicaux et subtropicaux à des températures avoisinant les 30 °C. La température optimale pour les *Penicillium* se situe quant à elle entre 20 et 25 °C, ce qui correspond à un développement s'effectuant sous des climats tempérés. Par conséquent, ces deux dernières espèces sont fréquentes en Europe occidentale et en Amérique du Nord (Whitlow et Hagler, 2001).

- d. Le pH : La majorité des moisissures se développent dans des pH acides. Les *Fusarium* se forment ordinairement quand la valeur des pH se situe entre 3 à 8, sachant toutefois qu'ils atteignent une croissance optimale avec des pH de 5 et 6, et qu'ils peuvent tolérer que la valeur du pH soit de 2,5 (Keller et coll., 1997).
- e. Endommagement des grains : Les grains cassés ou fissurés sont souvent envahis par des insectes et/ou des acariens et constituent un foyer favorable pour le développement des moisissures et la libération des toxines (Sinha, 1994, Rajendran, 2005).
- f. La composition gazeuse : La plupart des moisissures ont une croissance aérobique. Lorsque les denrées alimentaires sont conservées dans une atmosphère confinée où, de surcroît, la pression en oxygène est réduite et la teneur en CO<sub>2</sub> accrue, cela a pour effet d'inhiber la croissance des moisissures. Dès lors, sitôt que celles-ci se retrouvent à l'air libre, ceci peut rapidement entraîner une intense toxino-génèse (Le Bars et Le Bars, 1987).

D'autres facteurs peuvent influencer la production des mycotoxines, tels que le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Deep, 1991), la variété de la plante (Golinski et coll., 2002), les fongicides utilisés (Moss et Frank, 1985) et les différences géographiques (Langseth et coll., 1995).

#### **1.4 La toxicité des mycotoxines et leurs effets sur la santé des animaux**

La toxicité des mycotoxines est variable selon la molécule en cause, la fréquence d'exposition et la quantité absorbée. Elle peut être causée par la consommation d'une ou de plusieurs mycotoxines en grande quantité, donnant suite à une toxicité aiguë avec apparition rapide de symptômes (diarrhées, convulsions, etc.), bien que ce type d'exposition soit exceptionnel. En outre, la toxicité peut être causée par la consommation répétée de mycotoxines à faibles doses et à long terme (toxicité chronique). Cette dernière forme de toxicité est la plus redoutée (Jouany et coll., 2009). Le tableau 3 présente un sommaire des mycotoxines et de leurs conséquences.

Les effets des mycotoxines sont variés : cancérogènes, mutagènes, tératogènes, immunosuppresseurs, œstrogéniques, nécrosants, neurotoxiques et néphrotoxiques (Halewyn et Poulin, 2002). Le risque de cancérogénicité pour l'homme et l'animal a été évalué et scindé en quatre groupes, conformément aux procédures et aux pratiques en vigueur au CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer, composé de plusieurs groupes de travail interdisciplinaires d'experts scientifiques internationaux qui examinent les études publiées sur un agent particulier et évaluent le degré d'indication de cancérogénicité qu'il présente. À cette fin, ces experts s'appuient sur un ensemble de principes, de procédures et de critères scientifiques décrits dans le préambule aux monographies du CIRC. Ces documents mentionnent le classement d'agents qui a été retenu. Le classement dans l'une des catégories est provisoire vu que les monographies sont régulièrement actualisées). Ces quatre groupes sont les suivants :

- groupe 1 : il regroupe les mycotoxines pour lesquelles il existe des preuves suffisantes de cancérogénicité chez l'homme et chez l'animal (Peraica et coll., 1999) ;
- groupe 2 : il est composé de deux sous-groupes :
  - groupe 2 A : la toxine est probablement cancérogène pour l'homme. Aucune mycotoxine n'y figure ;
  - groupe 2 B : la toxine est peut-être cancérogène pour l'homme. L'aflatoxine M1, l'ochratoxine A et les toxines de *Fusarium* moniliforme (fumonisine B1 et B2) font partie de ce groupe (Brochard et Le Bacle, 2009). En règle générale, les trichothécènes de type B sont considérés comme étant plus toxiques que ceux du type A pour les ruminants (Schollenberger et coll., 2006) ;
- groupe 3 : il regroupe les mycotoxines pour lesquelles il n'est pas possible de se prononcer quant à leur cancérogénicité chez l'homme. On attribue cette incertitude à deux faits : d'une part, aucune équipe de chercheurs n'a réussi à attester d'une relation de cause à effet entre l'exposition à l'agent et la maladie du cancer ; d'autre part, aucune donnée expérimentale de cancérogénicité n'est disponible à l'heure actuelle. Dans ce groupe, on retrouve la citrinine, la patuline, la toxine T2, le DON et le nivalénol (Brochard et Le Bacle, 2009) ;

- groupe 4 : la toxine n'est probablement pas cancérogène pour l'homme et pour l'animal de laboratoire. Prenons à titre d'exemple le *Penicillium roqueforti* utilisé dans la préparation des fromages tel que le Roquefort.

**Tableau III :** Principales mycotoxines, le type de grain affecté et leurs effets néfastes sur la santé humaine et animale.

<b>Mycotoxine</b>	<b>Denrée</b>	<b>Champignon producteur</b>	<b>Conséquences de l'ingestion</b>
<b>DON/NIV</b>	blé, maïs orge	<i>F.raminearum</i> <i>F.culmorum</i> <i>F.rockwellense</i>	Intoxications humaines signalées en Inde, en Chine, en Corée et au Japon. Toxiques pour les animaux et en particulier pour les porcs (Li et coll., 2001, Pestka et Smolinski, 2005)
<b>ZON</b>	maïs, blé	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>	Identifiée par le CIRC comme étant potentiellement cancérogène pour l'animal. Affecte l'appareil reproducteur des truies (Gaumy et coll., 2001b).
<b>OTA</b>	orge, blé et autres denrées	<i>A.chraceus</i> <i>P.verrucosum</i>	Suspectée par le CIRC d'être cancérogène pour l'homme, les animaux de laboratoire et le porc (Castegnaro et McGregor, 1998).
<b>FB<sub>1</sub></b>	maïs	<i>F.monoliforme</i> et d'autres espèces	Suspectée par le CIRC d'être cancérogène pour l'homme et l'animal (Soriano et Dragacci, 2004). Toxique pour les porcs et les volailles. Responsable de la leuco-encéphalomalacie équine (ELEM), une maladie mortelle pour les chevaux (Marasas et coll., 1988).
<b>AFB<sub>1</sub> et B<sub>2</sub></b> <b>AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, et G<sub>2</sub></b>	maïs, arachides et autres denrées.	<i>A.flavus</i> <i>A.parasiticus</i>	Aflatoxine B1 et associations naturelles d'aflatoxines identifiées par le CIRC comme potentiellement cancérogènes chez l'homme (Eaton et Gallagher, 1994). Effets néfastes sur divers animaux et en particulier les poulets (Applegate et coll., 2009).

AF : Aflatoxine, FB : fumonisine, DON : Déoxynivalénol, OTA : Ochratoxine, ZON : Zéaralénone.

### **1.4.1 Toxicité aiguë**

Bien que la toxicité aiguë des mycotoxines soit relativement bien connue dans les élevages d'animaux de rente, elle reste rare et exceptionnelle (Reboux, 2006). Les premières manifestations décrites dès l'antiquité touchaient à l'ergotisme (Miller, 1994). L'intoxication se manifeste par des délires, des prostrations, des douleurs violentes, des abcès et des gangrènes des extrémités entraînant des conséquences graves, voire fatales (Jouany et coll., 2009). Ces symptômes sont provoqués par les propriétés vasoconstrictrices de la toxine du champignon (Klotz et coll., 2008). La famille des mycotoxines la mieux étudiée dans les cas de toxicité aiguë est celle des aflatoxines, qui est particulièrement redoutable pour sa cancérogénicité (Jouany et coll., 2009).

### **1.4.2 Toxicité chronique**

Les mycotoxicoses chroniques sont les plus fréquentes et les plus redoutées. Elles résultent d'une exposition répétée à de faibles doses de toxine, voire très faibles (Afssa, 2009). Certaines de ces toxicités chroniques exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines) ou se révèlent œstrogéniques (ZON), immuno/hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (toxines trémorgènes); (Jouany et coll., 2009).

La toxicité chronique des mycotoxines dépend de la molécule en cause, de la fréquence d'exposition et de la quantité absorbée (Jouany et coll., 2009). Dans les élevages industriels, les animaux reçoivent habituellement une ration relativement identique chaque jour, ce qui favoriserait des intoxications chroniques pour le cas où l'alimentation contiendrait des mycotoxines (Peraica et coll., 1999, Jouany et coll., 2009). Chez les vaches laitières, les mycotoxicoses chroniques sont rarement détectées par les éleveurs ou par les vétérinaires (Yiannikouris et Jouany, 2002).



## 2. Diagnostic des mycotoxines chez les ruminants

### 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<sub>β</sub>, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 (Azcona-Olivera et coll., 1995, Azcona-Olivera 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).

## **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.

### **2.2.1 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. Les échantillons humides peuvent être congelés ou séchés avant d'être expédiés et le délai d'acheminement doit être aussi court que possible.

### **2.2.2 Les différentes méthodes d'analyse :**

L'analyse des mycotoxines dans les aliments et les liquides biologiques est réalisée suivant deux types de méthodes :

- La méthode immuno-enzymatique ou ELIZA qui permet de distinguer dans de brefs délais les échantillons négatifs ou suspects. Cette méthode dite de dépistage est généralement caractérisée par une excellente sensibilité, mais elle peut être limitée en termes de spécificité (Afssa, 2009).

- La méthode physico-chimique ou chromatographique (ou méthode quantitative) qui permet de confirmer ou d'infirmer la présence de traces de mycotoxines.

### **2.2.2.1 La méthode ELIZA**

C'est la méthode la plus fréquemment utilisée puisque des kits sont disponibles et qu'elle est simple et rapide (Zöllner et Mayer-Helm, 2006). Ces techniques sont avantageuses lorsque l'objectif ne consiste qu'à conclure en la présence ou en l'absence de contamination, sans besoin de quantification précise. Il s'agit d'un test rapide qui requiert un délai de 3 à 24 heures. Les délais d'attente pour l'obtention des résultats sont ainsi beaucoup plus courts que ceux qui sont associés à la chromatographie. Contrairement aux méthodes chromatographiques, les kits ELISA engendrent des difficultés d'analyse imputables à la complexité des structures chimiques et à la diversité des mycotoxines contenues dans un lot. Cela est dû au fait que des réactions croisées peuvent se produire, et les molécules chimiquement proches de la mycotoxine recherchée peuvent alors être dosées en même temps que celle-ci (Diaz, 2005). Par exemple, les impuretés présentes dans l'urine pourraient réduire la capacité des anticorps à fixer les antigènes et engendrer à ce moment-là une surestimation des résultats (Liu et coll., 2007). D'autre part, les kits ne dosent qu'une mycotoxine à la fois et ne facilitent pas l'évaluation d'une multi contamination. Ils sont essentiellement limités à des aliments de composition relativement homogène, ce qui exclut des produits tels que la moulée ou le fromage, à cause des interférences présentes suscitant des limitations de la méthode. Ils utilisent des enzymes fragiles qui appellent à des conditions de conservation rigoureuses, en particulier la température de conservation. Les anticorps mis au point par les fabricants garantissent rarement une bonne spécificité pour une mycotoxine donnée compte tenu de la possibilité d'obtenir des faux-positifs et des faux-négatifs (Zöllner et Mayer-Helm, 2006). La capacité de prédiction varie selon le fabricant et le type de mycotoxines. L'exemple de la Corée en dit long sur le sujet. En effet, sur les 249 échantillons d'aliments analysés par ELIZA dans le but de détecter la présence d'AFB1, 27 échantillons avaient été qualifiés de positifs. Quantifiés une deuxième fois par HPLC, il s'est avéré que sur ces 27 échantillons, seul l'un d'entre eux contenait 11 ppb d'AFB1 tandis que pour les autres,

les mesures étaient inférieures au seuil de détection (Han et coll., 2006). Il est évident que les résultats obtenus avec la méthode ELISA étaient de faux positifs, probablement du fait d'une éventuelle contamination par des mycotoxines autres que l'AFB1. En conclusion, il semblerait que la méthode ELISA soit nécessaire pour la détection rapide des mycotoxines (Pleadin et coll., 2014), mais qu'il faille renforcer l'analyse par des méthodes analytiques telles que les méthodes séparatives chromatographiques.

### **2.2.2.2 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.

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 bovins laitiers. 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.

Dans le cadre d'expériences récentes, des chercheurs ont tenté d'établir un lien entre l'exposition des vaches laitières à des aliments contaminés à ZON en la mesurant dans les

urines. Les auteurs ont suggéré que la surveillance des concentrations de ZON urinaires pourrait représenter un outil utile pour prédire l'exposition des animaux à ZON et à d'autres toxines de *Fusarium* (Takagi et coll., 2013, Fushimi et coll., 2014).

L'analyse des mycotoxines dans les liquides biologiques : L'analyse des mycotoxines dans les fluides biologiques des bovins 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. La méthode a été utilisée avec succès chez les bovins à partir d'un essai effectué sur 30 vaches laitières nourries avec des rations à concentrations différentes de ZON et DON. 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.

**Tableau IV** : Les avantages et les inconvénients de la méthode immuno-enzymatique ou ELIZA et de la méthode physico-chimique ou chromatographique.

<b>Méthode</b>	<b>ELIZA</b>	<b>HPLC/ LC-MS/ MS</b>
<b>Précision</b>	Moyenne	Bonne
<b>se</b>	Excellente	Excellente
<b>sp</b>	Limitée, risque élevé de faux négatif/faux positif	Excellente, détecte spécifiquement de faibles quantités de mycotoxines
<b>Coût</b>	Peu coûteux	Coût élevé
<b>Vitesse</b>	Bonne	Mauvaise
<b>Quantification des mycotoxines</b>	Limitée, ne dose qu'une mycotoxine à la fois  Conclut à la présence ou à l'absence de contamination  Ne permet pas d'évaluer une multi contamination	Large, dose plusieurs mycotoxines à la fois

HPLC/ LC-MS/ MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse ou uniquement sur la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), SP : spécificité, SE : sensibilité.

### **3. Métabolisme des mycotoxines chez les ruminants**

Les ruminants sont plus résistants à la plupart des mycotoxines que les monogastriques, car leur flore ruminale joue un rôle détoxifiant en dégradant certaines mycotoxines (Hussein et Brasel, 2001, Jouany et coll., 2009). Ce processus fait appel à des étapes de détoxification résultant de l'action des enzymes de l'hôte et de sa flore microbienne (Jouany et coll., 2009). De telle manière, les toxines T-2 et HT-2, DON et diacétoxyscirpénol (DAS) sont toutes dégradées en molécules moins nocives lorsqu'elles sont administrées à des doses de 10µg/ml en présence de contenu du rumen (Prelusky et coll., 1987b). Plus spécifiquement, la T-2 est transformée en HT-2 et en néosolaniol, lesquels sont 10 fois moins toxiques que la molécule mère (Jouany et coll., 2009). Selon Côté et coll. ; (1986), les microorganismes du rumen dégradent le DON en ouvrant le cycle époxy pour former le diène 12,13 dé-époxy-déoxynivalénol ou DOM-1. Cette bioconversion du groupement époxy responsable de la toxicité est l'œuvre d'un époxyde réductase microbienne qui entraîne une diminution significative de la toxicité du DON chez les ruminants (Côté et coll., 1986, Jouany et coll., 2009). À l'opposé, la ZON est métabolisée à 90 % en  $\alpha$ -zéaralénol dont le pouvoir toxique est de trois à quatre fois plus important que la molécule mère (Kiessling et coll., 1984, Zinedine et coll., 2007).

### **4. Impacts économiques des mycotoxines**

Les retombées économiques engendrées par une contamination aux mycotoxines semblent être fortement négatives puisqu'elles se soldent par une dégradation de la qualité des produits agricoles et par des effets négatifs sur la santé de l'animal et sa productivité. Pourtant, peu de travaux ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact financier de ce type de contamination.

#### **4.1 Impact économique sur les cultures**

Il est très difficile d'évaluer avec exactitude la perte économique causée par les moisissures en agriculture. D'après la FAO, 25 % des récoltes seraient contaminées par des

mycotoxines chaque année, ce qui représenterait une perte d'environ 5 milliards de dollars si l'on tient compte des dommages causés à la fois aux cultures et aux élevages (Bhat et coll., 1999). Aux États-Unis, la FDA a estimé à 392 millions de dollars la perte totale engendrée par les aflatoxines, le DON et les fumonisines (Richard et coll., 2003). Wu, (2006) a pour sa part indiqué que le retrait du marché des aliments contaminés par les mycotoxines coûtait 342 millions de dollars annuellement aux États-Unis. Pour le maïs à lui seul, les coûts annuels des contaminations imputables aux aflatoxines, à la fumonisine B1 et au DON sont respectivement évalués à 163, 40 et 2 millions de dollars (Wu, 2006). De leur côté, (Schmale et Munkvold, 2009) ont estimé qu'aux États-Unis, les pertes associées au DON s'élevaient à 655 millions de dollars par année, la majorité de ces pertes étant attribuables au blé (Schmale et Munkvold, 2009).

## **4.2 Impact économique sur la santé et la reproduction des animaux**

Dans les pays d'Amérique du Nord, les conséquences économiques des mycotoxines sur la santé et la reproduction des animaux sont estimées à des milliards de dollars par année (Wu, 2007). Aux États-Unis, les pertes au niveau de la production animale sont estimées à 8,4 millions de dollars ; sachant que dans ce calcul figurent le nombre d'animaux malades à la suite de l'ingestion de mycotoxines, le coût du traitement ainsi que la valeur marchande de chaque animal (Wu, 2006). Les pertes causées par le DON se traduiraient quant à elles par une baisse de la consommation d'aliments et des performances de croissance, de même que par une altération des fonctions immunitaires et de reproduction (Etienne et Wache, 2008). De leur côté, les pertes provoquées par la ZON sont essentiellement liées à l'infertilité des animaux et, posant, à la diminution du nombre d'élevages, bien que cet aspect soit difficile à quantifier (Fink-Gremmels et Malekinejad, 2007).



## 5. Les mycotoxines rencontrées dans l'alimentation des bovins laitiers au Québec

Dans les climats tempérés comme ceux du Québec et du Canada, les mycotoxines les plus fréquemment rencontrées sont les trichothécènes (DON, NIV, toxine T-2 et HT-2), la ZON, les fumonisines (surtout la FB<sub>1</sub>), les ochratoxines et l'ergot, alors que les aflatoxines sont plus rares (Charmley et Trenholm, 2000). Le DON et la ZON sont les mycotoxines qui provoquent les plus grands dommages en alimentation animale. Ce mémoire s'intéresse plus particulièrement à deux mycotoxines – le DON et la ZON – car leurs niveaux de toxicité et leurs conséquences sur la santé et la reproduction des bovins laitiers ont été peu étudiés en condition de fermes commerciales. De plus, ce sont les mycotoxines les plus fréquentes au Canada (Charmley et Trenholm, 2000).

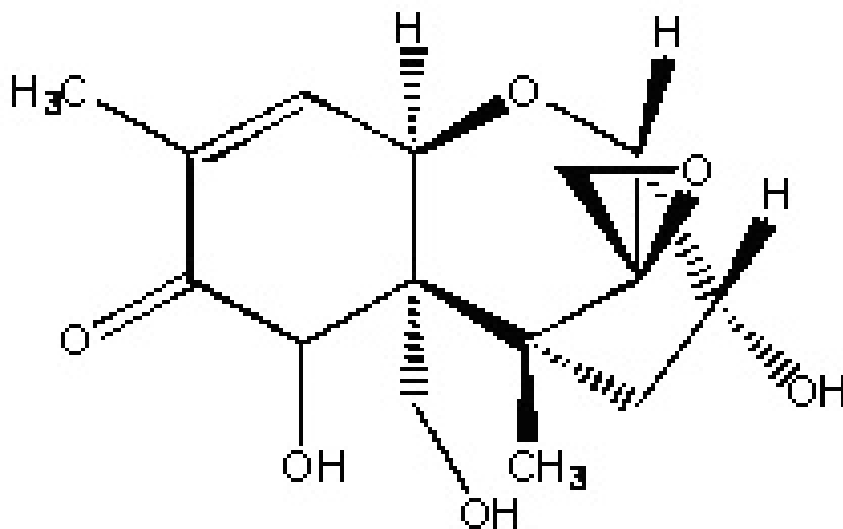
### 5.1 Le déoxynivalénol (DON)

Le DON appartient à la famille des trichothécènes. Il est produit par le *Fusarium graminearum* et le *F. culmorum* (Sobrova et coll., 2010) et a été isolé pour la toute première fois en 1972 dans de l'orge japonaise endommagée par le *F. graminearum* (Morooka et coll., 1972, Yoshizawa, 2013). C'est à la suite de vomissements constatés sur des porcs ayant consommé du maïs contaminé que Vesonder et coll ; (1973) ont déterminé que le composé actif était un trichothécène qu'ils ont dénommé « vomitoxine ». Cette mycotoxine figure parmi celles qui sont les plus communément détectées dans les aliments dans le monde (Vesonder et coll., 1973). Des enquêtes ont démontré que le DON était largement présent dans les céréales en tant que contaminant naturel (Liu et coll., 2012). Dans le cadre d'une enquête épidémiologique réalisée au Canada en 1993 sur une période de trois ans, le DON a été détecté dans 53 à 62 % des échantillons analysés, révélant ainsi qu'elle est la mycotoxine la plus fréquemment rencontrée dans le blé et l'orge (Stratton et coll., 1993).

#### 5.1.1 Propriétés physico-chimiques du DON :

Le DON appartient au groupe des sesquiterpénoides qui sont dotés d'un squelette tricyclique (trichothécane) formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons

oxygénés et quatre groupements méthyles. La fonction cétone en C8 caractérise les trichothécènes de type B. Le DON se différencie des autres trichothécènes B du fait de la présence de groupements hydroxyles (OH) en C3 et en C7 qui contribuent à sa toxicité, mais c'est principalement le groupement époxyde en C12-13 qui est responsable de sa toxicité (Vidal, 1990).



**Figure 1 :** Structure chimique du déoxynivalénol (DON).

### 5.1.2 Le DON et ses métabolites :

Chez les bovins, sous l'action des microorganismes intestinaux, le DON est métabolisé dans le tube digestif en dé-époxy-déoxynivalénol (DOM-1) (Yoshizawa et coll., 1986). Le DOM-1 est nettement détecté dans l'urine, le plasma et le lait par HPLC (Wu et coll., 2010). Par conséquent, il semble être un excellent biomarqueur pour estimer la consommation de DON.

Chez les animaux ayant des antécédents d'acidose ruminale, le DON n'est pas complètement métabolisé et sa présence est détectable dans le sang (Seeling et coll., 2006). Le DOM-1 est moins toxique que la molécule mère compte tenu de l'absence du noyau époxyde (Côté et coll., 1986). Le DON peut également être conjugué dans le foie pour donner un glucuronide de DON (Goyarts et Dänicke, 2006, Gratz et coll., 2013). Ce conjugué est moins toxique que le DON lui-même, car il n'interagit pas avec les sous-unités 60S des ribosomes et

est plus rapidement éliminé par l'urine (Saint-Cyr et coll., 2013). Diverses études ont révélé que les aliments contiennent de grandes quantités de DON acétylé, 3-acetyl-DON et 15-acetyl-DON et de DON présent sous forme de glucoside (essentiellement DON-3-glucoside Déoxynivale) dans des proportions pouvant atteindre 75 % de la quantité totale de DON (Berthiller et coll., 2009). Des auteurs ont démontré que sous l'action de certaines enzymes bactériennes, ces dérivés du DON pouvaient générer la molécule parente aussi bien en condition in vitro qu'en condition in vivo, notamment chez le rat et le porc (Eriksen et coll., 2003, Nagl et coll., 2012).

### **5.1.3 Les Effets du DON au niveau cellulaire**

#### **5.1.3.1 Effet moléculaire**

Après son entrée dans la cellule, le DON se lie aux protéines associées à l'Acide Ribonucléique Ribosomique l'ARNr telles que la protéine kinase R (PKR) et la protéine tyrosine kinase Hck (hematopoietic cell kinase) par l'interaction de son fragment époxyde conduisant à l'activation des protéines kinases (les MAP kinases). La perte de la fraction d'époxyde du DON-1 conduit à l'absence d'effet cellulaire suite à son incapacité à se lier aux ribosomes indépendamment de son entrée cellulaire (Karlovsy, 2011, Saint-Cyr et coll., 2013). Les MAP Kinases activées diffèrent selon les doses de DON utilisées. Ainsi, une faible dose de DON (de l'ordre du nanomètre) active préférentiellement l'ERK (Extracellular Signal Regulated Protein Kinase), provoquant ainsi la survie cellulaire et l'expression des gènes, alors qu'une dose élevée (de l'ordre du micromètre) active les p38, conduisant pour leur part à l'apoptose (Maresca, 2013). Une étude récente a montré que le DON affecte la phosphorylation de 188 protéines, y compris des protéines impliqués dans le cycle cellulaire, la transcription, la modulation épigénétique, la biogenèse, la différenciation cellulaire et l'organisation du cytosquelette (Pan et coll., 2013). De la sorte, le DON a la capacité d'inhiber la synthèse des protéines en se fixant aux ribosomes. En effet, sa cible principale est la sous-unité 60S du ribosome (Ehrlich et Daigle, 1987). Ce phénomène est connu sous le nom de « ribotoxic stress réponse » (Iordanov et coll., 1997).

### **5.1.3.1 Effet immunitaire**

Le DON est immunostimulant ou immunosuppresseur selon la dose, la fréquence et la durée de l'exposition ainsi que le type immunitaire (Pestka et coll., 2004). À fortes doses, le DON inhibe le système immunitaire (immunosuppresseur) par une baisse des taux d'IgM et d'IgG dans le sérum, une diminution de la résistance aux pathogènes, une inhibition de la réponse antigénique (Pestka et Smolinski, 2005), l'apoptose des cellules des macrophages (Yang et coll., 2000, Zhou et coll., 2003) et des lymphocytes B et T (Pestka et coll., 2004). En revanche, à faibles doses, le DON stimule le système immunitaire (immunostimulant) par une augmentation des taux immunoglobulines A (IgA) plasmatiques et un accroissement de l'expression de plusieurs gènes liés à l'immunité tels 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, Sugita-Konishi et Pestka, 2001), les chémokines MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein) (Pestka et coll., 2004) ou encore le gène de la cyclooxygénase-2, COX-2 (Moon et Pestka, 2002). L'augmentation de la concentration en IgA découle de la libération de cytokine IL-6 par les lymphocytes T et les macrophages, induite par le DON (Pestka et coll., 2004). Par conséquent, les IgA sériques sont généralement utilisées comme marqueur biologique d'une intoxication au DON.

### **5.1.4 Voies d'excrétion et d'élimination de DON:**

Chez les ruminants, l'excrétion du DON s'effectue principalement par voie urinaire et fécale, majoritairement sous formes conjuguée et déépoxydée (Prelusky et coll., 1987a).

#### **5.1.4.1 Voie fécale et urinaire:**

Chez la vache, environ 20 % de la dose ingérée de DON sont éliminés dans l'urine et les matières fécales sous forme de DOM-1 (à 96 %) et de DON (à 4 %) (Côté et coll., 1986). Le DON est principalement acheminé par la voie biliaire et faiblement absorbé dans l'intestin et se retrouve majoritairement dans les fèces (de 54 à 75 %) (Yiannikouris et Jouany, 2002).

#### **5.1.4.2 Voie lactée :**

Le DON n'est détecté dans le lait que si le bovin reçoit une ration amplement contaminée par la mycotoxine (Prelusky et coll., 1984). En effet, suite à des essais menés sur deux vaches auxquelles une dose unique de 920 mg de DON avait été administrée, les résultats ont révélé que le lait contenait une concentration de DON libre ou conjuguée de 4µg/L seulement (Prelusky et coll., 1984).

#### **5.1.5 Effets de DON sur la santé des bovins laitiers :**

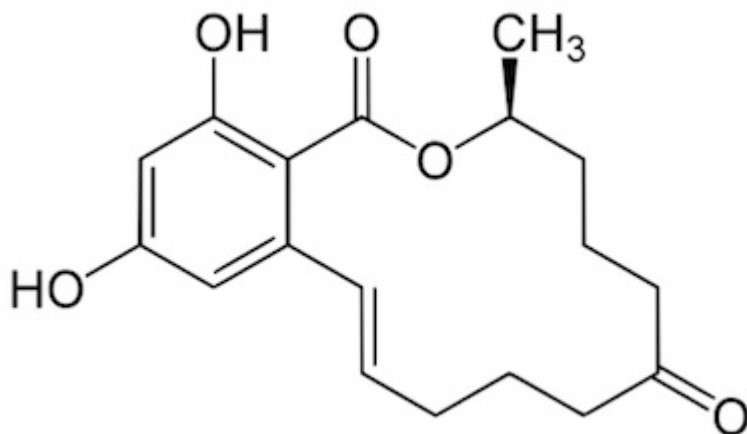
L'impact du DON sur la santé des bovins laitiers n'est pas bien établi, mais certaines données cliniques suggèrent une association entre la consommation de DON et les mauvaises performances des animaux. Whiltow et Hagler (2008) ont rapporté une augmentation de l'incidence des maladies, parmi lesquelles figurent le déplacement de la caillette, la cétose, la rétention placentaire, la métrite et la mammite. D'autres études font état d'une réduction de la consommation alimentaire (Trenholm et coll., 1985, Whitlow et coll., 1994), mais sans établir pour autant d'effet causal entre les deux facteurs. Certaines études ont malgré tout permis de déceler les effets néfastes du DON. Par exemple, les résultats d'une étude canadienne menée sur 18 vaches (19,5 kg de lait en moyenne) consommant des rations contaminées au DON dans des proportions allant de 2,6 à 6,5 ppm indiquent que ces vaches avaient tendance à produire moins de lait (13 % ou 1,4 kg) que les vaches contrôlées (Charmley et coll., 1993). Dans le cadre d'une autre étude, il a été conclu que les vaches consommant 2,5 ppm de DON produisaient par jour 1,5 kg de lait en moins (Diaz et coll., 2001). Hélas, étant donné que les études évaluant les effets de la consommation de DON sont souvent menées sur des échantillons de petite taille, leur validité externe manque de puissance. De plus, comme les dosages de DON varient d'une étude à l'autre, il est difficile de les comparer les unes aux autres et de les comparer à ce qui se produit lors de contaminations naturelles sur les fermes.

## 5.2 La zéaralénone (ZON)

La ZON est produite par plusieurs espèces de *Fusarium*, notamment le *F. graminearum* (anciennement appelé *F. roseum*), le *F. culmorum*, le *F. equiseti* et le *F. verticillioides* pendant les saisons fraîches et humides de croissance et de récolte des céréales. La ZON a été isolée pour la première fois en 1962 à partir de maïs contaminé par *Giberellazea* (Gaumy et coll., 2001a, Gromadzka et coll., 2008). Cette toxine peut se former avant ou après la récolte si les conditions de stockage et de triage ne sont pas optimales (Zinedine et coll., 2007). Elle est présente dans l'ensilage, le foin, le maïs et d'autres céréales (Gaumy et coll., 2001a). Dans une enquête épidémiologique réalisée au Canada en 1993, la ZON a été détectée dans 25 à 29 % des échantillons de blé et d'orge analysés, révélant ainsi qu'elle est l'une des mycotoxines les plus fréquemment rencontrées (Stratton et coll., 1993).

### 5.2.1 Propriétés physico-chimiques de la ZON :

La structure chimique de la ZON est similaire à celle de l'œstrogène. C'est un lactone de l'acide résorcyclique de formule brute  $C_{18}H_{22}O_5$ , sans toxicité intrinsèque (Urry et coll., 1966, Kuo et coll., 1967). Elle comporte un groupe hydroxyle phénolique et du  $17\beta$ -œstradiol, ce qui lui permet de se lier aux récepteurs d'œstrogènes présents sur les cellules (Urry et coll., 1966, Kuo et coll., 1967). La ZON pure se présente sous forme de cristaux blancs, son poids moléculaire est de 318 g/mol et son point de fusion est de l'ordre de 164 à 165 °C (Gaumy et coll., 2001b). Elle prend une couleur bleu-vert fluorescente lorsqu'elle est excitée par des longueurs d'onde élevées (360 nm) et une couleur vert plus intense en présence de longueurs d'onde plus faibles (260 nm). Le maximum de fluorescence dans l'alcool éthylique est observé pour une longueur d'onde d'environ 314 nm, avec une émission à 450 nm. Cette propriété est très utilisée en chromatographie pour le dosage (Gaumy et coll., 2001b).



**Figure 2 : Structure chimique de la zéaralénone (ZON).**

### 5.2.2 La ZON et ses métabolites :

La ZON possède de nombreux métabolites ( $\alpha$ -zéaralénol,  $\beta$ -zéaralénol,  $\alpha$  zéaralanol ou zéranol,  $\beta$ -zéaralanol ou taléranol, zéaralanone, etc.), mais les principaux sont l' $\alpha$ -zéaralénol ( $\alpha$ -ZOL) et le  $\beta$ -zéaralénol ( $\beta$ -ZOL). En effet, même si l'on détecte la présence de  $\alpha$ -ZOL et de  $\beta$ -ZOL sous forme libre et sous forme glucurono-conjuguée dans l'urine, cette biotransformation reste marginale par rapport à la réduction en ZON (Kleinova et coll., 2002). Plus de 90 % de la ZON peuvent être métabolisés en  $\alpha$ -ZOL et, dans une moindre mesure, en  $\beta$ -ZOL et en zéranol par les microorganismes du rumen (Kiessling et coll., 1984). L'activité œstrogénique de  $\alpha$ -ZOL est plus élevée que celle de la ZON et de  $\beta$ -ZOL, puisque l'affinité de ces dernières pour les récepteurs œstrogéniques est faible. La ZON est 70 fois moins puissante que  $\alpha$ -ZOL et deux fois plus puissante que  $\beta$ -ZOL (Frizzell et coll., 2011). Ainsi, la bioconversion de la ZON en  $\alpha$ -ZOL est une réaction de bioactivation, alors que celle de la ZON en  $\beta$ -ZOL est considérée comme une inactivation (Malekinejad et coll., 2006).

### 5.2.3 Les Effets de la ZON au niveau cellulaire

La ZON et ses métabolites sont capables d'adopter une conformation suffisamment proche de  $17\beta$ -estradiol et d'autres œstrogènes naturels et peuvent se lier compétitivement aux récepteurs cytoplasmiques œstrogéniques (Kiang et coll., 1978). Le complexe récepteur cytoplasmique de la ZON (ou de son dérivé) migre vers le noyau et incite la synthèse d'ARN

polymérase ; la prolifération cellulaire et l'augmentation de la taille des organes sexuels conduisant à des signes d'hyperœstrogénisme (Kuiper-Goodman et coll., 1987). Cependant, le potentiel œstrogénique varie selon les métabolites. L' $\alpha$ -ZOL montre une plus grande affinité pour les récepteurs œstrogéniques que la ZON, ayant elle-même plus d'affinité que  $\beta$ -ZOL (Everett et coll., 1987, Shier et coll., 2001). L'  $\alpha$ -ZOL, le  $\beta$ -zéaralanol et la zéaralénone possèdent respectivement une affinité 15 fois, 50 fois et 1 000 fois moins importante que le  $17\beta$ -estradiol pour la fixation aux récepteurs (Everett et coll., 1987).

Des études in vitro portant sur la fonction cellules interstitielles de souris mâles ont démontré que l'exposition à la ZON et à  $\alpha$ -ZOL pouvait interférer avec le processus de spermatogenèse réduisant la synthèse de testostérone stimulée par l'hormone chorionique gonadotrope (HCG)(Yang et coll., 2007a). Les résultats ont démontré une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux ainsi qu'une diminution significative des spermatozoïdes vivants chez les souris mâles traitées avec des doses différentes de ZON (Yang et coll., 2007b). Les effets de la ZON sur les femelles sont similaires ; les études réalisées ont démontré une augmentation du poids de l'utérus, de la synthèse d'ARN et des protéines (Greenman et coll., 1979, Heneweer et coll., 2007).

#### **5.2.4 Voies d'excrétion et d'élimination de ZON:**

La ZON est rapidement absorbée et éliminée par l'organisme. Elle est métabolisée par le foie de même que par la muqueuse intestinale et elle est excrétée dans l'urine et la bile. La ZON est très peu stockée dans les tissus (Gaumy et coll., 2001b).

##### **5.2.4.1 Voie urinaire :**

La ZON est principalement excrétée par voie urinaire. La quasi-totalité de l'excrétion urinaire est observée dans les 48 heures suivant l'administration de la mycotoxine (Fitzgerald et coll., 1998, Gaumy et coll., 2001b). Des études menées en Nouvelle-Zélande montrent d'ailleurs que les taux urinaires de la ZON et de ses principaux métabolites,  $\alpha$ -ZOL et  $\beta$ -ZOL, peuvent être utilisés pour évaluer avec précision la quantité ingérée de ZON (Sprosen et Towers, 1995). Par conséquent, il pourrait s'avérer pertinent de la doser dans l'urine.



Chez la vache en lactation, la ZON et les zéaralénols sont détectables dans l'urine sous forme libre ou conjuguée ; 84 % des métabolites urinaires de la ZON se présentent sous les formes glucuronique et sulfate-conjuguée (Mirocha et coll., 1981, Gaumy et coll., 2001b). Le ratio des concentrations en ZON totale,  $\alpha$ -ZOL et  $\beta$ -ZOL est d'environ 29 % pour la ZON, 20 % pour  $\alpha$ -ZOL et 51 % pour  $\beta$ -ZOL. Dans toutes les analyses effectuées, le  $\beta$ -ZOL a systématiquement été le métabolite dont la concentration était la plus élevée (Mirocha et coll., 1981).

#### **5.2.4.2 Voie biliaire :**

La ZON est éliminée par la bile sous forme de métabolites conjugués (Galtier, 1998). Dans une étude réalisée en Allemagne, il s'est avéré sur 108 échantillons de bile de bovins analysés, 97 contenaient de la ZON ou l'un de ses métabolites (Meyer et coll., 2002). Chez les ruminants, on détecte 68 % de  $\beta$ -ZOL, 24 % d' $\alpha$ -ZOL et 8 % de ZON dans la bile (Meyer et coll., 2002). Aucune étude sur le passage de la ZON et de ses métabolites dans les fèces des ruminants n'a été rapportée à ce jour.

#### **5.2.4.3 Voie lactée :**

Les mycotoxines et leurs métabolites sont essentiellement excrétés par les voies urinaire et fécale, mais leur passage dans le lait est possible, bien qu'à un taux très faible inférieur à 1 % (Yiannikouris et Jouany, 2002, Diaz, 2005). En effet, lors d'une étude réalisée sur des vaches ayant reçu des doses uniques de 1,6 g et de 8 g de ZON, les doses retrouvées dans le lait ne s'élevaient qu'à 0,008 % et 0,016 %, respectivement (Diaz, 2005). Par surcroît, l'ingestion quotidienne de 544,5 mg de ZON pendant 21 jours a provoqué l'apparition de ZON et de  $\alpha$ -ZOL dans le lait de vache, avec un taux de transfert cumulé de 0,06 % (Prelusky et coll., 1990). L'excrétion est à son maximum dans les deux à trois jours qui suivent l'ingestion, tandis que les résidus sont proportionnels à la quantité de mycotoxine administrée (Prelusky et coll., 1990). Une étude plus récente est parvenue aux mêmes conclusions quant à la ZON et le DON ; les taux de rapport calculés variaient entre 0 et 0,0075 % pour la ZON et ces métabolites, et entre 0 et 0,0017% pour le DON (Winkler et coll., 2015).

Dans la plupart des études précitées, la ZON a été mesurée dans le lait par ajout de toxines pures à la ration. Ce mode de distribution ne correspond pas aux conditions naturelles de contamination des aliments. En effet, la présence simultanée de plusieurs toxines, souvent observée dans la nature, peut modifier le métabolisme de chacune d'elles et modifier éventuellement leur mode d'excrétion.

### **5.2.5 Effets de la ZON sur la santé des bovins laitiers :**

Plusieurs études ont associé la ZON à des effets œstrogéniques se traduisant par des avortements, des cycles d'œstrus anormaux, des vaginites et des baisses de performance en reproduction. Ces conclusions sont celles qui sont le plus fréquemment rapportées chez les bovins et les porcs (Khamis et coll., 1986, Fink-Gremmels et Malekinejad, 2007). De tels effets pourraient aussi conduire à la formation de tumeurs hépatiques et pituitaires chez les souris (Creppy, 2002). Dans les troupeaux laitiers, des problèmes d'infertilité associés à la présence de ZON dans des foins ont été identifiés à partir d'enquêtes réalisées aux États-Unis (Mirocha et coll., 1968). En Nouvelle-Zélande, des cas d'infertilité au pâturage ont également été notés chez des brebis et des génisses (Towers et Sprosen, 1993). Ainsi, Linn et Chapman (2002) ont déterminé que l'ingestion d'aliments contenant des doses supérieures à 0,5 ppm de ZON pouvait entraîner une baisse de fertilité, cité par Afssa (2009). De leur côté, Coppock et coll. (1990) ont observé lors d'une étude sur le terrain une réduction de la prise alimentaire et de la production laitière, la présence de diarrhée ainsi que des problèmes de reproduction après avoir fourni à des vaches une ration faiblement contaminée avec 1,5 ppm de ZON et 1,5 ppm de DON (Coppock et coll., 1990).

## **6. Les concentrations de toxicité du DON et de la ZON**

Les premiers règlements visant à limiter la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires ont été élaborés en 1960, après la découverte de l'AFB1. À l'heure actuelle, environ 100 pays (correspondant à environ 85 % de la population mondiale) ont des réglementations visant les mycotoxines (Van Egmond et coll., 2007). Au Canada, l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) a élaboré une fiche d'information dans laquelle

sont établis les seuils de tolérance des mycotoxines potentiellement présentes dans les aliments destinés aux bovins et aux bovins laitiers. En fonction des mycotoxines, ces niveaux sont soit des maximums légaux, soit des directives réglementaires, soit de simples recommandations.

### **6.1 Seuils du DON**

La directive réglementaire de l'Agence canadienne d'inspection des aliments indique un niveau maximal de contamination de 1 à 5 ppm de DON dans la ration destinée aux bovins laitiers. Une étude menée en Caroline du Nord suggère qu'une concentration dépassant 0,5 ppm de DON dans la ration des bovins laitiers établit un niveau d'attention (Whitlow et Hagler, 2001). D'après cette étude, au-delà de ce seuil, l'impact négatif sur la performance et la santé des animaux risque d'être observé. Il est intéressant de constater que l'étude des effets toxiques du DON se heurte à une difficulté particulière : les résultats expérimentaux sont souvent en décalage avec les conditions réelles, et ce, en raison de la possible présence d'autres trichothécènes et des interactions susceptibles de se produire entre eux.

### **6.2 Seuils de la ZON**

Selon le comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires, le niveau d'attention suggéré pour les bovins laitiers est de 0,3 ppm dans la ration (Whitlow et Hagler, 2008). Pour sa part, l'Agence canadienne d'inspection des aliments préconise un niveau maximal de contamination de 10 ppm de ZON ou de 1,5 ppm de ZON si d'autres toxines sont présentes.

## **7. Les facteurs influençant les seuils**

En règle générale, il est très difficile d'établir le seuil de toxicité des différentes mycotoxines avec précision. Celui-ci varie en fonction du statut immunitaire ou de l'état de santé de l'animal, de son stade physiologique, de la durée d'exposition et de l'interaction avec d'autres mycotoxines.

## **7.1 Le stade physiologique**

Les sujets les plus sensibles sont les vaches en période de transition ainsi que les fortes productrices (Jouany et coll., 2009). Des études ont effectivement révélé que 100 ppm de fumonisines réduisaient la production laitière chez les bovins laitiers (Diaz et coll., 2000), alors que 148 ppm n'affectaient pas le gain moyen quotidien chez les bovins de boucherie (Osweiler et coll., 1993). Cela pourrait être attribuable à un stress accru subi par les vaches laitières en début de lactation, en comparaison avec l'état des bovins de boucherie. Par surcroît, la réaction d'un animal à un aliment contaminé par une mycotoxine peut être aggravée par d'autres facteurs telles que l'espèce animale concernée, la carence en éléments nutritifs ou la présence de facteurs agressifs de l'environnement (température, entassement, etc.) (Charmley et Trenholm, 2000).

## **7.2 La synergie entre les mycotoxines**

Étant donné que les animaux sont nourris d'un mélange d'aliments et que les moisissures peuvent produire plusieurs toxines, de multiples mycotoxines risquent d'être présentes dans un même aliment (Hagler et coll., 1984). Ces dernières peuvent interagir pour provoquer des symptômes différents ou plus sévères que dans le cas d'un contact avec une mycotoxine individuelle (Tajima et coll., 2002, Speijers et Speijers, 2004). En effet, il est possible que des effets de synergie se produisent entre plusieurs toxines T-2 et OTA, T-2 et les FB, DAS et FB, AF et OTA, et AF et T-2 (Tajima et coll., 2002, Luongo et coll., 2006, McKean et coll., 2006, Bouslimi et coll., 2008, Klarić et coll., 2008, Schwarzer, 2009). Une expérimentation effectuée sur des porcelets au moyen de concentrations comprises entre 10 et 40 ppm de FB1 et entre 20 et 39 ppm d'OTA a provoqué la mort subite de ces porcelets dans les 13 à 18 semaines subséquentes à plusieurs jours de contamination. Ces porcelets ont présenté à la fois de l'œdème pulmonaire et des lésions rénales et hépatiques résultant de la combinaison de l'OTA et de la FB1 (Creppy et coll., 2004). On remarque aussi que l'acide fusarique accroît la toxicité des fumonisines chez le poulet et celle de la FB1, du DAS et du DON chez le porc (Smith et MacDonald, 1991, Smith et coll., 1997, D'mello et coll., 1999). Par ailleurs, il apparaît que la

combinaison de l'acide fusarique avec de la ZON augmente de deux à cinq fois la concentration de chaque toxine dans le lait (Porter et coll., 1998). L'évolution des connaissances sur le mécanisme d'action et la cinétique des trichothécènes couplée à une meilleure compréhension des autres mycotoxines permettent aujourd'hui de conclure à l'implication simultanée de plusieurs mycotoxines (Nathanail et coll., 2015, Male et coll., 2016). De ce fait, on en vient à voir que les aliments contaminés naturellement sont plus toxiques que les aliments fabriqués en laboratoire (Smith et coll., 2016). Ainsi, l'aflatoxine issue de la culture est plus toxique pour les bovins laitiers que l'aflatoxine pure ajoutée au régime alimentaire (Applebaum et coll., 1982), tandis que chez les porcs, le DON pur rajouté aux régimes alimentaires est moins toxique que le DON naturellement contaminé, à concentrations égales (Foster et coll., 1986). De nos jours, de plus en plus de chercheurs tiennent compte de la contamination multiple par plusieurs mycotoxines dans leur design expérimental (Chen et coll., 2008).

### **7.3 La flore ruminale**

Le métabolisme des mycotoxines par les bovins est complexe et comprend plusieurs voies de bioactivation et de détoxification résultant de l'action d'enzymes de l'hôte et de la flore microbienne présente dans leur tube digestif. De plus, la bioconversion de certaines mycotoxines par les microorganismes est susceptible d'augmenter leur toxicité, comme c'est le cas pour la ZON (Gaumy et coll., 2001b). En revanche, la détoxification s'amointrit s'il y a un dysfonctionnement du rumen, comme dans le cas de l'acidose ruminale. De même, si le régime alimentaire ne favorise pas un fonctionnement optimal de la flore ruminale, il est possible que l'animal soit plus sensible aux effets des mycotoxines (Hussein et Brasel, 2001). Le dysfonctionnement de l'écosystème microbien peut aggraver le risque de mycotoxicose.

Pour l'ensemble de ces raisons, il est très difficile d'établir avec précision le seuil de toxicité des différentes mycotoxines. À tous ces facteurs s'ajoute le fait que la toxicité d'une mycotoxine variera à la fois en fonction du statut immunitaire de l'animal ou de son état de santé et en fonction de la durée d'exposition. En dépit de ces obstacles, de nombreux pays ont adopté depuis quelques décennies des réglementations visant les mycotoxines, et des

règlementations plus récentes continuent d'être mises en place. Lorsqu'on évoque les seuils de tolérance présentés dans la fiche de renseignements de l'ACIA, le Dr Trenholm rappelle qu'ils sont principalement basés sur des études portant sur des mycotoxines individuelles (Charmley et Trenholm, 2000). Dès lors, il donne à entendre que des recherches plus poussées sur les interactions des mycotoxines les unes avec les autres et avec d'autres facteurs environnementaux et nutritionnels permettraient de valider et éventuellement de modifier ces directives (Charmley et coll., 1993, Rotter et coll., 1994).

## **8. Problématique**

Au Québec, les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées dans la ration des troupeaux laitiers sont le DON et la ZON. L'impact du DON est souvent associé à une diminution de la consommation volontaire de matière sèche, de la production laitière et des capacités du système immunitaire. La ZON a quant à elle un effet œstrogénique susceptible d'induire des troubles de la reproduction ainsi qu'une baisse de fertilité. À l'heure actuelle au Canada, le seuil d'acceptabilité de la contamination de l'alimentation animale par les mycotoxines est régi par une directive réglementaire préconisant un taux de concentration maximale de 1 à 5 ppm de DON. Néanmoins, des chercheurs américains (Whitlow et Hagler, 2008) suggèrent qu'une concentration de seulement 0,5 ppm de DON pourrait avoir une incidence sur la production laitière et la reproduction des élevages, et qu'il en serait de même avec une concentration maximale de 1,5 (si d'autres toxines sont présentes) à 10 ppm de ZON. La contradiction entre ces différentes normes montre toute la difficulté de déterminer un seuil sécuritaire de mycotoxines pouvant être présentes dans l'alimentation animale, sans compter que ces concentrations sont aussi influencées par des facteurs environnementaux. En effet, l'activité toxique des mycotoxines est plus importante lorsque la contamination s'effectue dans le milieu naturel et non en laboratoire, où les résultats obtenus sont divergents. C'est la raison pour laquelle une certaine confusion règne quant au niveau acceptable de mycotoxines dans la ration des bovins laitiers préconisé par le Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (Charmley et Trenholm, 2000).

Depuis quelques années, la mesure des mycotoxines dans les fluides biologiques est devenue possible grâce aux méthodes chromatographiques. Ces méthodes ouvrent la porte à une nouvelle approche de diagnostic basée sur la relation entre les principaux symptômes d'une mycotoxicose (clinique ou subclinique) et le niveau d'intoxication retrouvé dans les fluides biologiques des animaux. À l'heure actuelle, on ne connaît pas le taux de concentration de mycotoxine dans les fluides biologiques susceptible de produire des effets néfastes subséquents sur la santé et la reproduction des vaches dans un contexte de fermes laitières commerciales. Les quelques données disponibles proviennent d'études contrôlées en station de recherche. Dès lors, vu qu'il est difficile de se faire une idée précise des conséquences que peut avoir la consommation d'aliments contaminés par des mycotoxines sur la santé et la production des bovins laitiers, la mesure de la teneur en mycotoxines chez l'animal pourrait s'avérer un meilleur outil de diagnostic des mycotoxicoses.

## **9. Objectifs de recherche**

La présente étude a pour objectif général d'établir un diagnostic des mycotoxicoses chez les troupeaux de vaches laitières par la détermination des niveaux à risque des mycotoxines DON et ZON dans l'aliment et les fluides biologiques (sang et urine) associés à des impacts négatifs sur la santé et la reproduction subséquentes de ces vaches. Afin d'atteindre cet objectif, deux principales cibles sont visées :

- quantifier les mycotoxines DON et ZON dans l'aliment, le sang et l'urine des bovins laitiers ;
- déterminer des seuils de concentrations alimentaire, sérique et urinaire des mycotoxines associées à un impact sur la santé et les performances des bovins laitiers.

## **Chapitre 2 : Article**

### **Identification des concentrations acceptables de mycotoxines dans l'aliment, le sérum et l'urine chez les vaches laitières.**

Nacera Tazerout, Jocelyn Dubuc, Younès Chorfi

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.



## Résumé

Au Québec, les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées dans la ration des bovins laitiers sont le déoxynivalénol (DON) et la zéaralénone (ZON). Cette étude avait pour objectifs de quantifier les mycotoxines DON et ZON chez des vaches laitières naturellement contaminées dans l'aliment, le sérum et l'urine, ainsi que d'identifier les concentrations de ces mycotoxines associées à des problèmes de santé, de production et de reproduction chez les vaches laitières. L'étude s'est déroulée en deux phases : une première phase a été réalisée sur 60 troupeaux laitiers pour identifier leurs niveaux de contamination aux mycotoxines et une deuxième phase a été réalisée en sélectionnant les 15 troupeaux présentant des concentrations sériques les plus basses de DOM-1 et 15 troupeaux ayant des concentrations de DOM-1 les plus élevées. Des échantillons d'aliment, d'urine et de sang provenant de vaches entre 7 et 100 jours en lait ont été collectés pour analyser les mycotoxines. Les risques d'avortement et d'endométrite clinique étaient plus élevés chez les vaches exposées à une concentration alimentaire de DON  $\geq 6,74$  ppm et  $\geq 3,21$  ppm, respectivement. Aussi, le risque d'hypercétonémie était plus élevé chez les vaches ayant reçu des aliments ayant une concentration  $\geq 0,09$  ppm de ZON. Une concentration urinaire de ZON  $\geq 2,70$  ppb était associée à une baisse de performance en reproduction, alors qu'une concentration urinaire de  $\beta$ -ZOL  $\geq 6,23$  ppb augmentait le risque de réforme et diminuait la production laitière. Ces données permettront aux médecins vétérinaires et aux nutritionnistes d'affiner les recommandations qu'ils font aux producteurs laitiers à propos de la gestion des mycotoxines.

**Mots clés :** déoxynivalénol, zéaralénone, vache, aliment, urine, sérum.

## Abstract

In Quebec, the most common mycotoxins found in the diet of dairy cattle are deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON). The objective of this study was to quantify DON and ZON mycotoxins in dairy cows naturally contaminated in food, serum and urine, as well as to identify the concentrations of these mycotoxins associated with health, production and Breeding in dairy cows. The study was conducted in two phases; A first phase was carried out on 60 dairy herds to identify their levels of mycotoxin contamination and a second phase was carried out by selecting 15 herds with the lowest DOM-1 and 15 herds with DOM- 1 the highest. Food, urine and blood samples from cows between 7 and 100 days in milk were collected to analyze mycotoxins. The risks of abortion and clinical endometritis were higher in cows exposed to a dietary DON concentration of  $\geq 6.74$  ppm and  $\geq 3.21$  ppm, respectively. Also, the risk of hypercetonemia was higher in cows fed  $\geq 0.09$  ppm of ZON. A urinary concentration of ZON  $\geq 2.70$  ppb was associated with a decrease in reproductive performance, whereas a urinary  $\beta$ -ZOL  $\geq 6.23$  ppb increased the risk of reform and decreased milk production. This will allow veterinarians and nutritionists to refine their recommendations to dairy producers on mycotoxin management in dairy farms.

**Keywords:** deoxynivalenol, zearalenone, cow, food, urine, serum.

## Introduction

Les mycotoxines sont des composés organiques complexes et toxiques produits par des champignons microscopiques appelés moisissures. Les mycotoxines sont des contaminants courants des produits agricoles (Binder et coll., 2007) et leur présence dans les aliments destinés aux animaux d'élevage est une problématique majeure pour la production laitière (Yiannikouris et Jouany, 2002). Elles sont souvent soupçonnées de causer des pertes financières importantes pour les éleveurs parce qu'elles augmentent l'incidence de maladies et réduisent les performances de production et de reproduction (Boudra, 2009). Il existe plus de 300 mycotoxines différentes découvertes à ce jour (Pohland, 1993). Les plus fréquemment rencontrées et les plus préoccupantes dans l'alimentation des bovins laitiers au Québec sont le déoxynivalénol (DON; également dénommé vomitoxine) et la zéaralénone (ZON) (Charmley et Trenholm, 2000).

Le DON est généralement associé à une baisse de la consommation volontaire d'aliments et de production, une augmentation de l'incidence des maladies telles que le déplacement de la caillette, de la cétose, de la rétention placentaire, de la métrite et de la mammite (Whitlow et coll., 1994, Whitlow et Hagler, 2008). Quant à la ZON, elle est mise en cause pour les effets œstrogéniques qu'elle génère, contribuant ainsi à des troubles de la reproduction et à une diminution de la fertilité (Kallela et Ettala, 1983, Whitlow et Hagler, 2008).

Chez les bovins laitiers, les mycotoxicoses peuvent être aiguës ou chroniques, selon la dose consommée. Dans les conditions d'élevage actuelles, les formes aiguës n'existent pratiquement plus (Jouany, 2005). En revanche, les formes chroniques dues à une consommation répétée de faibles doses sont plus redoutables. En effet, ces formes chroniques ne présentent pas de symptômes cliniques spécifiques, mais elles sont fréquentes. De plus, comme les concentrations ingérées varient amplement, cela complexifie le diagnostic de la contamination (Boudra, 2009).

À l'heure actuelle, une certaine confusion règne quant au niveau acceptable de mycotoxines dans la ration des bovins laitiers et aucun seuil n'a été établi à ce jour pour circonscrire leurs niveaux acceptables dans les fluides biologiques, notamment le sang et l'urine. L'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) recommande de ne pas dépasser le seuil de 1 ppm pour le DON et de 10 ppm (1,5 ppm si autres toxines présentes) pour la ZON (Charmley et Trenholm, 2000). Outre le fait que plusieurs facteurs sont à prendre en considération pour évaluer les effets nocifs de ces mycotoxines tels que l'état physiologique de l'animal, son état de santé, et ainsi de suite, il ne faut pas perdre de vue que celles-ci semblent interagir les unes avec les autres (Yiannikouris et Jouany, 2002). Les seuils de tolérance présentés dans la fiche de renseignements de l'ACIA sont principalement basés sur des études portant sur des mycotoxines individuelles ; les rares données disponibles provenant d'études contrôlées en station de recherche. La présente étude avait pour objectif de déterminer les concentrations de mycotoxines (DON, ZON et leurs métabolites) dans les aliments, l'urine et le sang des vaches laitières associées à des effets négatifs sur la santé, la production et la reproduction des vaches laitières.

## **Matériels et méthodes**

### **1. Sélection des troupeaux et récolte des échantillons**

La présente étude s'est déroulée en deux phases ; la première phase correspondant à une étude observationnelle transversale a été menée sur 60 troupeaux laitiers commerciaux Holstein provenant des régions Montérégie, Centre-du-Québec et l'Estrie. Les entreprises laitières participantes ont été sélectionnées par convenance et l'étude s'est déroulée en octobre 2012. Chacun des producteurs devait avoir la volonté de participer à l'étude et accepter de ne pas utiliser d'anti-mycotoxines pendant le déroulement de l'étude. La ferme devait impérativement posséder un logiciel lui permettant de compiler électroniquement les données de santé animale du troupeau, avoir un minimum de 50 vaches en lactation et recourir aux services d'un médecin vétérinaire pour un suivi régulier de médecine préventive (minimum d'une visite par mois). Une visite de ferme a été réalisée par un technicien et un médecin vétérinaire pour procéder à la collecte des données. Lors de cette visite, 5 vaches

entre 7 et 100 jours en lait (JEL) étaient sélectionnées au hasard. Un prélèvement sanguin a été collecté sur les vaches choisies à partir de la veine coccygienne avec une aiguille 20G dans un tube sec stérile de 10 ml (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ, USA). Les échantillons ont été conservés rapidement à 4 °C après le prélèvement. Tous les échantillons prélevés instantanés ont été transférés dans une glacière et ont été conservés dans un environnement avoisinant 4°C et ce pendant toute la durée de transport. Au laboratoire les échantillons ont été conservés rapidement à 4 °C dans un réfrigérateur. En moins de 24 heures, le sang récolté dans les tubes était centrifugé à 3500 tours/minute, pendant 10 minutes. Ensuite, les sérums ont été transférés dans des tubes en plastique de 5 ml (Sarsted Inc., Newton, NC, USA). Des échantillons d'urine ont été effectués par massage de la région périvulvaire où un minimum de 20 ml a été récolté puis conservé à 4 °C. Un échantillon représentatif des aliments a été collecté avant qu'il ne soit servi aux vaches, et puis conservé dans un sac hermétique sans air afin de prévenir toute prolifération supplémentaire de moisissures. En moins de 24 heures, les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'au moment d'analyse.

De nature cohorte observationnelle, la deuxième phase de la présente étude a été menée sur 30 des 60 troupeaux laitiers sélectionnés dans la première phase, à savoir les 15 troupeaux ayant eu des concentrations sériques les plus basses (non quantifiables) de DOM-1 ( $\leq 2$  ppb) et les 15 troupeaux ayant eu des concentrations les plus élevées de DOM-1 ( $\geq 6$  ppb). Cette phase s'est déroulée sur une période de 12 mois, soit de janvier 2013 à décembre 2013. Les fermes ont été visitées par un technicien et un médecin vétérinaire deux fois durant l'année, à raison d'une visite par période de 6 mois. À l'instar de la 1<sup>ère</sup> phase, des prélèvements de sang au niveau des vaisseaux coccygiens, d'urine par massage de la région péri-vulvaire et d'échantillon représentatif de la ration alimentaire ont été effectués sur 12 vaches ayant entre 7 et 100 JEL, sélectionnées au hasard. Les échantillons ont été préparés puis maintenus à une température de 4°C avant d'être soumis au laboratoire de chromatographie aux fins de quantification du DON, de la ZON et de leurs métabolites. Les

performances des vaches enrôlées pour un suivi en matière de santé, de production et de reproduction ont été surveillées pendant 300 jours.

Les données recueillies portaient sur la rétention placentaire, le déplacement de la caillette, la production laitière projetée sur 305 jours, la réforme, l'avortement, l'hypercétionémie et l'endométrite clinique. Les vaches considérées pour la rétention placentaire étaient celles dont les membranes fœtales n'avaient pas été expulsées dans les 24 heures après vêlage, qu'il y ait eu ou non complications post-partum. Les vaches considérées pour le déplacement de la caillette étaient celles pour lesquelles le diagnostic avait été confirmé par un vétérinaire par visualisation directe ou palpation, pendant la chirurgie ou à la suite d'une analyse des gaz de sang. La production laitière projetée sur 305 jours est la somme de production journalière de lait durant 305 jours. La réforme renvoie à toute vache éliminée du troupeau au cours de l'étude, quel que fût le motif de réforme. L'avortement reflète toute expulsion d'un fœtus mort suivant le diagnostic de gestation. L'hypercétionémie a été prise en compte lorsque les concentrations sériques de BHBA étaient supérieures ou égales à 1,4 mmol / L dans les deux premières semaines du vêlage. L'endométrite clinique désigne un écoulement vaginal purulent. Les données sur les maladies ont été exportées du système informatisé DSA (DSHR Inc., Saint-Hyacinthe, QC, Canada).

## **2. Analyse des mycotoxines et de leurs métabolites**

Le DON et son métabolite DOM-1 ont été mesurés dans le sérum par chromatographie à haute performance (HPLC) en phase inverse dans le laboratoire de chromatographie à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. La méthode utilisée pour la détection est basée sur celle publiée par Valenta (Valenta et coll., 2003). Un volume de 1 ml de sérum a été incubé à 37 °C durant 16 heures avec 60 µl de β-glucuronidase (sigma G-0876) et 1 ml du tampon acétate. Les échantillons ont été successivement disposés sur une colonne d'immuno-affinité spécifique du DON (DONtest WBVicam, Milford, MA, USA), sur lesquels 3 ml de méthanol ont été ajoutés. Par la suite, les échantillons ont été évaporés à sec et les résidus remis en suspension dans 200 µl de phase mobile constituée d'acétonitrile et d'eau. Après extraction de la toxine, les échantillons ont été transférés dans des fioles de 1,5 ml, puis

directement placés sur autoéchantillonneur pour être analysés par HPLC muni d'un détecteur UV à une longueur d'onde de 218 nm. La lecture des résultats a été faite sur une colonne Synergi Hydro-RP, 250 x 4,6 mm, 4 µm, à 40 °C. Le calcul des concentrations de chaque toxine se faisait directement sur leur courbe standard correspondante en ng/ml, avec une limite de quantification (sensibilité analytique) de 1 ng/ml pour le DON et 2 ng/ml pour son métabolite DOM-1.

La ZON et ses deux métabolites  $\alpha$ -ZOL et  $\beta$ -ZOL ont été mesurés dans l'urine par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). La détection des toxines a été réalisée selon la méthode publiée par Songsermsakul et coll; 2006 et adaptée dans le laboratoire de chromatographie à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal. Un volume de 1,5 ml d'urine a été incubé à 37 °C pendant 16 heures avec 5 ml du tampon acétate 0,05 M et 50 µl de  $\beta$ -glucuronidase (sigma G-0876). Par la suite, chaque échantillon a été mélangé avec 6 ml de PBS et ajusté à un pH de 7,4 par l'ajout de NaOH 1M. Les échantillons ont été successivement disposés sur une colonne immuno-affinité spécifique de ZON (zearalatest, WBVicam, Milford, MA, USA) sur laquelle 1,5 ml de l'acétonitrile ont été ajoutés pour libérer les toxines. Les échantillons ont ensuite été évaporés à sec et les résidus remis en suspension dans 250 µl de phase mobile. Après extraction des toxines, les échantillons ont été transférés dans des fioles de 1,5 ml, puis placés sur une colonne (Agilent, Zorbax, ExtendC18, 2,1x150 mm, 3,5 µm, à 25C). La détection a été effectuée par LM-MS avec une source d'ionisation en mode positif de type APCI. Le calcul des concentrations de chaque toxine se faisait directement sur leur courbe standard correspondante en ng/ml, en tenant compte de la prise et du facteur de dilution. La limite de quantification (sensibilité analytique) était de 0,4 ng/ml pour la ZON, de 2 ng/ml pour  $\alpha$ -ZOL et de 4 ng/ml pour  $\beta$ -ZOL.

La quantification des mycotoxines dans les rations totales mélangées (RTM) a été effectuée par LC-MS, à l'aide d'un échantillon de 12,5 g de RTM préalablement moulues en vue d'obtenir des particules d'environ 2 mm, séchées et broyées en même temps que 100 ml d'un mélange d'acétonitrile et d'eau 80:20 pour assurer l'extraction des mycotoxines. Les échantillons ont été agités pendant 1 heure, puis filtrés sur papier Whatman N° 595 ½. Après

l'extraction des mycotoxines, les échantillons et les standards ont été installés sur la chambre manifold SPE Bond Elut mycotoxine, auxquels 6 ml de préparation standard ont été ajoutés. Par la suite, chaque échantillon a été évaporé à sec et les résidus ont été remis en suspension dans 250 µl de phase mobile. Au final, les échantillons ont été transférés dans des fioles ambrées de 2 ml et placés sur une colonne (Agilent, Zorbax, Eclipse XDB- C18, 4.6 x150 mm, 5 µm) à 40 °C. Le volume d'injection était de 60 µl et le débit de la pompe, de 0,6 ml/min. Une séquence d'analyse a été réalisée avec la source ESI en mode négatif tandis que l'autre séquence l'a été avec la source APCI en mode positif. Une courbe d'étalonnage de standards de 25 à 1000 ng/ml a été injectée en même temps que les échantillons, permettant la quantification des mycotoxines. La limite de quantification (sensibilité analytique) de toutes les mycotoxines dans les rations était de 25 ppb.

### **3. Analyses statistiques**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Des statistiques descriptives ont été calculées en utilisant PROC FREQ, MEANS et UNIVARIATE dans SAS. La vache a été considérée comme unité d'intérêt pour déterminer les concentrations de mycotoxines dans les fluides biologiques à partir desquelles le risque de maladies subséquentes augmentait. Afin de déterminer les seuils de concentrations de mycotoxines associées à des effets négatifs subséquents sur la santé des vaches, les concentrations de mycotoxines DON et ZON et de leurs métabolites (DOM-1,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL) ont été dichotomisées. Toutes les données ont été stratifiées en percentiles 25, 50, 75, 90 à l'aide de la procédure PROC UNIVARIATE dans SAS. Une table de contingence 2x2 a été ultérieurement utilisée pour identifier le seuil de chacune des mycotoxines ayant la plus grande somme de sensibilité et spécificité, en vue de prédire une maladie spécifique. Parmi ces maladies figuraient l'avortement, l'hypercétonémie et l'endométrite clinique. Une table de contingence a été construite pour chaque combinaison de maladie et percentile de mycotoxines. De cette façon, un seuil pour chacune des mycotoxines a été testé pour chacune des maladies investiguées dans l'étude. Un test de Chi-carré a été réalisé sur ces tables de contingence (PROC FREQ), pour une combinaison de maladie et de mycotoxine et c'est le seuil



ayant la somme maximale de sensibilité et de spécificité qui a été retenu. Si la valeur du P de cette association était  $\leq 0,25$ , ce seuil était retenu et offert comme variable dans un modèle multivarié de régression logistique mixte pour chacune des maladies. Il s'agissait du modèle multivarié contenant la variable de maladie choisie ainsi que la saison et la parité de l'animal (PROC GLIMMIX). Une approche similaire a été utilisée pour la réforme. Pour évaluer l'effet des mycotoxines sur la production laitière, la valeur projetée de production laitière sur 305 jours lors du 2<sup>e</sup> contrôle laitier de la lactation a été utilisé. Un modèle univarié de régression linéaire a été employé pour déterminer si la valeur de p était  $\leq 0,25$  (PROC MIXED). Dans un tel cas, un modèle multivarié de régression linéaire mixte a été appliqué. Les variables offertes incluaient aussi la saison et la parité de l'animal (PROC MIXED). Pour la reproduction, un modèle univarié à risque proportionnel de Cox (analyse de survie de l'intervalle entre le vêlage et la saillie fécondante; PROC PHREG) a été utilisé pour identifier les seuils de mycotoxines ayant une valeur de P  $\leq 0,25$ . Dans un tel cas, un modèle multivarié incluant également la saison et la parité a été employé pour identifier les seuils associés à la reproduction (PROC PHREG). L'effet d'agrégation du troupeau dans ces modèles a été considéré en utilisant des modèles mixtes.

## Résultats

Pour la première phase, 300 échantillons de sang et d'urine ont été prélevés, de même que 60 échantillons d'aliments sur lesquels les concentrations de DON, DOM-1, ZON,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL ont été quantifiées. Le DON a été le plus fréquemment quantifiable au niveau de l'aliment, le DOM-1 au niveau sérique, la ZON au niveau alimentaire et les métabolites de la ZON au niveau urinaire.

Pour la deuxième phase, 305 échantillons de sang ont été prélevés pour quantifier DON et DOM-1, 305 échantillons d'urine pour quantifier ZON,  $\alpha$ -ZOL et  $\beta$ -ZOL et 30 échantillons d'aliments pour quantifier le DON, la ZON et leurs métabolites. Au total, 455 vaches ont été utilisées pour estimer l'association entre les mycotoxines et les différentes maladies. Ces échantillons provenaient de 30 troupeaux dont 77 % étaient logés en stabulation attachée. Le

diagnostic des maladies s'est effectué durant la période de l'étude. Chez les vaches échantillonnées, la prévalence (moyenne  $\pm$  écart-type) était de  $(8,0 \pm 1,4)$  % pour l'avortement, de  $(25,0 \pm 2,8)$  % pour la réforme, de  $(11,0 \pm 3,0)$  % pour l'hypercétionémie et de  $(10,0 \pm 2,0)$  % pour l'endométrite clinique. La production laitière projetée à 305 jours moyenne des vaches de l'étude était de  $9896 \pm 1224$  kg. L'intervalle moyen entre le vêlage et la saillie fécondante était de  $106 \pm 48$  jours.

Afin de déterminer s'il y avait une association entre les mycotoxines et l'avortement, l'endométrite clinique, l'hypercétionémie et la réforme, une régression logistique a été utilisée en se basant sur le seuil ayant la somme maximale de sensibilité et de spécificité. Pour ajuster les modèles, ont été pris en compte l'effet de la saison et l'effet d'agrégation du troupeau. Les seuils retenus pour l'endométrite clinique et l'avortement équivalaient à une concentration alimentaire de DON  $\geq 3,21$  ppm et  $\geq 6,74$  ppm, respectivement. En ce qui concerne la réforme, le seuil retenu était la concentration urinaire de  $\beta$ -ZOL  $\geq 6,23$  ppb alors que pour l'hypercétionémie, le seuil retenu était la concentration de ZON  $\geq 0,09$  ppm dans l'aliment (tableau I).

**Tableau I :** Résultats des analyses univariées sur les différentes concentrations retenues qui ont été déterminées sur la base du seuil ayant la plus grande somme de sensibilité et de spécificité pour prédire l'association avec l'avortement, l'endométrite clinique, l'hypercétionémie et la réforme.

maladies	Mycotoxine	Seuil	Se	Sp	SE+SP	VPP	VPN	P
<b>Avortement</b>	DON aliment	≥6,74 ppm	26,6	91,2	117,8	25,0	92,0	<0,01
<b>Endométrite clinique</b>	DON aliment	≥3,21 ppm	39,7	76,3	116,0	27,2	60,2	<0,01
<b>Hypercétionémie</b>	ZON aliment	≥0,09 ppm	44,6	69,5	114,1	27,6	82,8	<0,01
<b>Réforme</b>	β-ZOL urine	≥6,23 ppb	14,5	91,4	105,9	37,0	75,0	0,07

DON : déoxynivalénol, ZON : zéaralénone, β-ZOL : β-zéaralénol, Se : sensibilité, Sp : spécificité, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative.

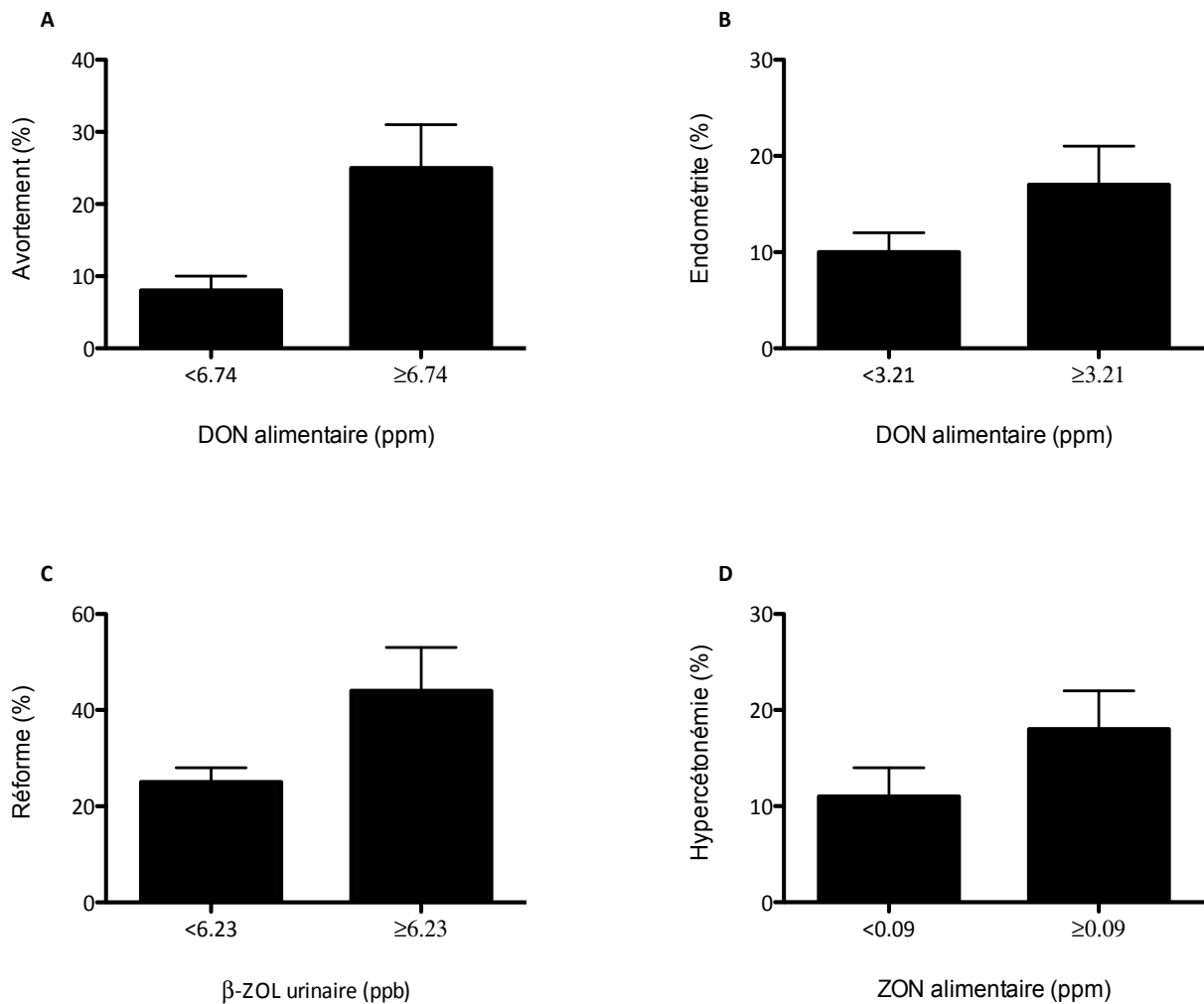
Les résultats des modèles finaux (tableau II) démontrent une augmentation du risque de maladies parmi les vaches exposées à une certaine concentration de mycotoxine alimentaire. Comparativement aux vaches exposées à des concentrations plus basses, le risque d'avortement chez les vaches exposées à une concentration de DON ≥ 6,74 ppm dans l'aliment était 3,7 fois plus élevé (P<0,01). Chez les vaches exposées à une concentration alimentaire de DON ≥ 3,21 ppm, le risque d'endométrite clinique était 1,9 fois plus élevé (P = 0,03). Chez les vaches exposées à des concentrations ≥ 0,09 ppm de ZON dans l'aliment (P = 0,02), c'est le risque d'hypercétionémie qui était 1,8 fois plus élevé. Enfin, chez les vaches ayant une concentration urinaire β-ZOL ≥ 6,23 ppb, le risque de réforme était 2,4 fois plus élevé (P = 0,03).

**Tableau II :** Résultats des analyses multivariées finales visant à prédire l'association avec l'avortement, l'endométrite clinique, l'hypercétonémie et la réforme.

<b>Condition</b>	<b>Mycotoxine</b>	<b>Seuil</b>	<b>RC</b>	<b>IC95%</b>	<b>P</b>
<b>Avortement</b>	DON aliment	≥6,74 ppm	3,7	1,8-7,8	<0,01
<b>Endométrite clinique</b>	DON aliment	≥3,21 ppm	1,9	1,1-3,3	0,03
<b>Hypercétonémie</b>	ZON aliment	≥0,09 ppm	1,8	1,1-3,0	0,02
<b>Réforme</b>	β-ZOL urine	≥6,23 ppb	2,4	1,1-5,1	0,03

RC= rapport de cotes; IC95%=intervalle de confiance à 95%; DON : déoxynivalénol, ZON : zéaralénone, β-ZOL : β-zéaralénol, P : p-value.

La figure 1 présente les moyennes des moindres carrés des modèles statistiques finaux et démontre individuellement l'augmentation des avortements, des endométrites cliniques, des hypercétonémies et des réformes chez les vaches laitières consommant une ration contenant une concentration élevée d'une mycotoxine spécifique.



**Figure1:** Histogramme de répartition du pourcentage d'avortement (A), d'endométrite clinique (B), de réforme (C) et d'hypercétonémie(D) chez les vaches laitières consommant une ration naturellement contaminée avec du DON et de la ZON.

Par ailleurs, pour déterminer s'il y avait une association entre les mycotoxines et la baisse de la reproduction (augmentation de l'intervalle vêlage saillie fécondante), une analyse de survie a été réalisée à l'aide d'un modèle proportionnel de Cox (Proc PHREG). Comme pour les autres modèles, l'étude était basée sur le seuil ayant la somme maximale de sensibilité et spécificité. Le seuil retenu a été la concentration de ZON  $\geq 2,70$  ppb dans l'urine (tableau III). Les résultats du modèle final (tableau IV) démontrent que les vaches présentant une

concentration de ZON  $\geq 2,70$  ppb dans l'urine devenaient gestantes à une vitesse équivalente à 0,57 fois que celle des vaches ayant une concentration urinaire plus basse ( $P = 0,02$ ). Les vaches exposées à une haute concentration devenaient ainsi gestantes plus lentement que les autres. La figure 2 correspond à la courbe de survie affichée sous la forme d'un graphique de Kaplan-Meier illustrant cette baisse.

**Tableau III :** Résultat d'analyse univariée sur la concentration retenue d'après le seuil de la plus grande somme de sensibilité et de spécificité en vue de prédire une association d'une baisse de performance en reproduction.

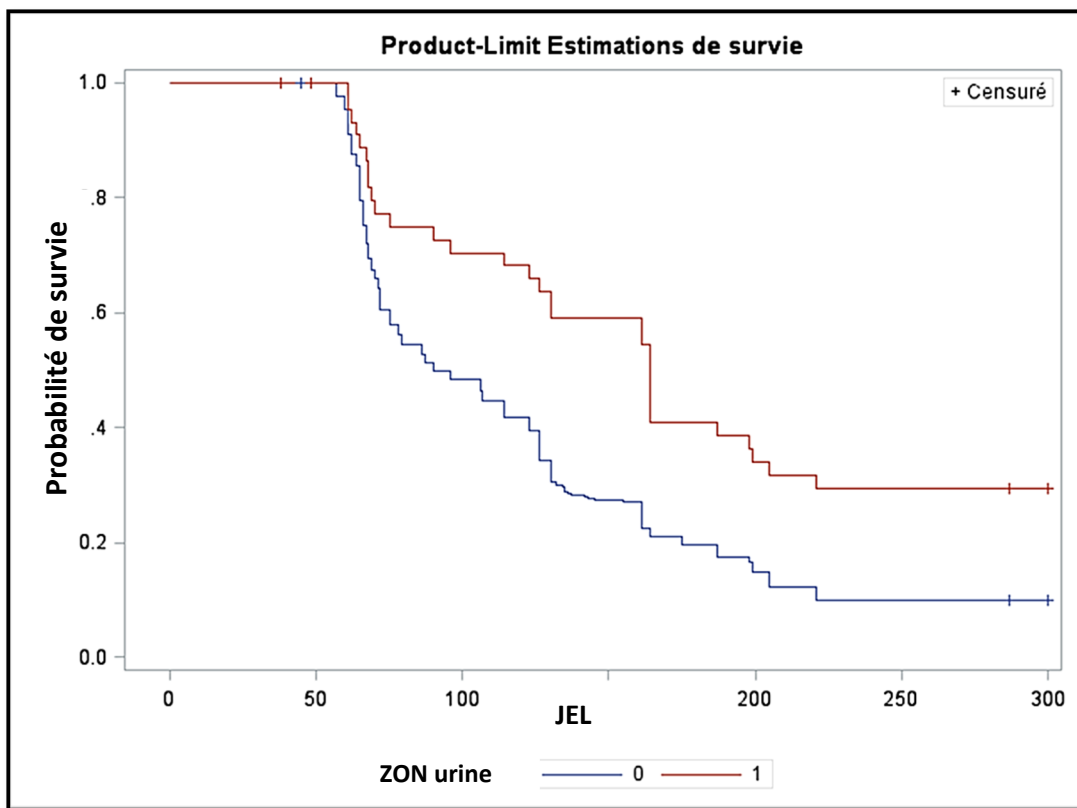
Condition	Mycotoxine	Seuil	Se	Sp	SE+SP	VPP	VPN	P
Reproduction (IVSF)	ZON urine	$\geq 2,70$ ppb	6,1	86,6	92,7	27,2	52,9	0,01

ZON : zéaralénone, Se : sensibilité, Sp : spécificité, VPP : valeur prédictive positive, VPN : valeur prédictive négative, IVSF : Intervalle vêlage saille fécondante.

**Tableau IV :** Résultat d'analyse multivariée finale visant à prédire la baisse de reproduction des vaches laitières.

Condition	Mycotoxine	Seuil	RC	IC95%	P
Reproduction (IVSF)	ZON urine	$\geq 2,70$ ppb	0,57	0,36-0,90	0,02

RC = rapport de cotes; IC95 % = intervalle de confiance à 95 %; ZON : zéaralénone; P : p-value, IVSF : Intervalle vêlage saille fécondante.



Jel : jours en lait, ZON : zéaralénone

**Figure 2 :** Courbe de survie affichée sous la forme d'un graphique de Kaplan-Meier – Temps jusqu'à la gestation pour des groupes de vaches ayant différentes concentrations de ZON dans leur urine (0 bleu : < 2,70 ppb; 1 rouge: ≥ 2,70 ppb).

L'impact des mycotoxines sur la production laitière a été estimé par une régression linéaire mixte (PROC MIXED) ajustée pour la parité et la saison. Les vaches ayant une concentration urinaire de  $\beta$ -ZOL  $\geq 6,23$  ppb dans l'urine avaient produit 365 kg de lait (projection sur 305 JEL) en moins que les vaches ayant une concentration urinaire plus basse ( $P = 0,07$ ). Ce résultat n'était pas significatif, mais suggérait une tendance.

## Discussion

La présente étude est la première à quantifier les mycotoxines aux niveaux alimentaire, sérique et urinaire dans un cadre observationnel reflétant le contexte réel de vaches laitières appartenant aux troupeaux commerciaux du Québec. Elle est également l'unique étude connue suggérant des seuils à risque au niveau urinaire. Les résultats de la présente étude suggèrent que chez les vaches exposées à des concentrations élevées de DON et de ZON, les risques de maladie, de baisse des performances de production et de reproduction et de réforme précipitée sont plus élevés que chez les vaches exposées à des concentrations plus basses.

Les résultats expérimentaux sont souvent en discordance avec les conditions réelles du terrain en raison de la présence d'autres mycotoxines et des interactions susceptibles de se produire entre elles. Néanmoins, certaines données cliniques ont démontré une association entre la consommation de fortes doses de DON et les mauvaises performances des bovins laitiers (Fink-Gremmels, 2008). En revanche, il n'existe que peu de données dévoilant un rapport entre la consommation de faibles doses de DON et la performance des animaux. Les quelques données disponibles suggèrent une augmentation de l'incidence de maladies tels que le déplacement de la caillette, l'hypercétonémie, la rétention placentaire, la métrite et la mammite, mais sans que la relation de cause à effet ne soit établie (Whitlow et Hagler, 2008). Il convient toutefois de signaler qu'à ce jour, aucune étude n'a mentionné que certaines concentrations de DON pouvaient augmenter les risques d'avortement et d'endométrite clinique. La présente recherche est la première à démontrer cette association en s'appuyant sur des concentrations contenues dans une diète naturellement contaminée, dans des conditions d'élevage réelles. L'étude a révélé que les rations contenant une concentration de DON  $\geq 6,74$  ppm augmentaient d'environ 4 fois la cote d'avortement, et que les rations contenant une concentration de DON  $\geq 3,21$  ppm augmentaient d'environ 2 fois la cote d'endométrite clinique. Ces résultats indiquent donc qu'une concentration alimentaire de DON  $\geq 3,21$  ppm serait liée à des problèmes de santé et de reproduction chez les vaches laitières. Bien qu'ils soient en opposition avec la majorité des expériences précédentes qui ont



rapporté des doses plus élevées (Charmley et coll., 1993, Ingalls, 1996, Winkler et coll., 2014a), il convient de rappeler que la plupart des études précitées ont été réalisées en station de recherche avec des mycotoxines individuelles et ne considéraient pas une exposition naturelle à plusieurs mycotoxines en même temps (Morgavi et Riley, 2007, Pestka, 2007, Gallo et coll., 2015). Une étude récente a révélé qu'une concentration de 5 ppm de DON alimentaire n'avait eu aucun effet sur le poids corporel, l'ingestion de MS et le rendement laitier des vaches laitières (Winkler et coll., 2014a). Dans le cadre d'une autre étude, il s'est avéré qu'une concentration de DON alimentaire à 8 ppm n'avait eu aucun effet sur la prise alimentaire et la production laitière sur une période de trois semaines (Ingalls, 1996). Certaines études ont toutefois établi un lien entre la consommation de DON et la réduction de la consommation alimentaire ainsi que la baisse de la production laitière (Trenholm et coll., 1985, Charmley et coll., 1993, Diaz et coll., 2001). Trenholm et coll. (1985) ont rapporté une légère baisse de consommation alimentaire de 1 kg / 100 kg de poids corporel chez des vaches ayant reçu un aliment contaminé avec 6,4 ppm de DON. Charmley et coll. (1993) ont également rapporté une baisse de production laitière de 13 % (1,4 kg/jour) chez des vaches consommant des rations contaminées par du DON dans des concentrations comprises entre 2,6 et 6,5 ppm. Diaz et coll. (2001) en ont conclu que les vaches consommant 2,5 ppm de DON produisaient 1,5 kg de lait en moins par jour. Les résultats contradictoires concernant l'effet du DON sur la production et la reproduction des vaches laitières émanant de ces études mettent en relief l'intérêt qu'il y aurait à mener plus de recherches avec des rations naturellement contaminées servies dans des conditions d'élevage réelles.

Dans la présente étude, nous avons noté un risque plus élevé de maladies associées à la ZON aux niveaux alimentaire et urinaire, ainsi qu'à son métabolite  $\beta$ -ZOL au niveau seulement urinaire. L'association entre la concentration de ZON dans l'urine  $\geq 2,70$  ppb et l'augmentation de l'intervalle vêlage-saillie fécondante n'est pas surprenante compte tenu de l'effet œstrogénique de la ZON (Kallela et Ettala, 1983, Whitlow et Hagler, 2008). Par ailleurs, les concentrations de ZON et de ses métabolites dans l'urine des bovins sont considérées

comme des biomarqueurs potentiels indiquant l'exposition à la ZON (Prelusky et coll., 1989, Usleber et coll., 1992).

De nombreuses recherches ont révélé une association entre la ZON et des problèmes de reproductions telles que l'infertilité et l'hyperoestrogénisme chez les bovins (Weaver et coll., 1986, Coppock et coll., 1990, D'mello et coll., 1999). Lors d'une recherche contrôlée où des génisses recevaient 250 mg de ZON dans des capsules de gélatine par voie orale une fois par jour, pendant 3 cycles œstraux consécutifs; le taux de fécondité a chuté d'environ 25 % (Weaver et coll., 1986). Dans une autre étude mettant en avant un aliment contaminé par 1,5 ppm de ZON, les chercheurs ont constaté une fertilité médiocre avec des épisodes fréquents d'œstrus, des vaginites et une hypertrophie des glandes mammaires des génisses (Coppock et coll., 1990). Cependant, la plupart des études ont démontré cette association avec des concentrations de ZON établies au niveau de l'aliment.

L'association entre la ZON et ses métabolites et la baisse de production laitière est rarement évoquée ; le DON étant plus souvent incriminé (Charmley et coll., 1993, Whitlow et Hagler, 2008). La présente étude a établi un lien entre une concentration de  $\beta$ -ZOL urinaire  $\geq 6,23$  ppb et une diminution de la production laitière de 365 kg projetée sur 305 jours, à raison de 1,2 kg de perte par jour (tableau II). De rares travaux ont évoqué une baisse de production laitière associée à une autre mycotoxine que le DON, parmi lesquels celui de Diaz et coll; (2000) où des bovins laitiers (Holstein et Jersey) recevant des rations contenant 100 ppm de fumonisine pendant sept jours environ avant la mise bas et pendant 70 jours par la suite ont généré une production laitière réduite (6 kg/vache/jour). Cette association est probablement liée à l'interaction existante entre les différentes mycotoxines.

À ce jour, ce projet a établi deux nouvelles associations qui n'avaient pas été rapportées dans la littérature. En effet, il a été révélé que le risque d'hypercétonémie était plus élevé chez les vaches consommant une ration alimentaire  $\geq 0,09$  ppm de ZON. Le risque de réforme était également plus élevé lorsque la concentration du  $\beta$ -ZOL au niveau urinaire était  $\geq 6.23$  ppb. Nulle autre étude n'avait établi ce lien auparavant. Probablement, cela est dû au fait que de nombreuses études ont établi une corrélation entre la présence de ZON dans les rations

alimentaires et une baisse de performance en reproduction (Khamis et coll., 1986, Fink-Gremmels et Malekinejad, 2007). Par ailleurs, plusieurs études ont établi une corrélation entre l'hypercétionémie et la baisse de performance en reproduction (Fourichon et coll., 2000, Hammon et coll., 2006, Dubuc et coll., 2010). Sachant aussi que la baisse de performance en reproduction est une cause importante de réforme chez les vaches. En effet, selon le Rapport de décembre 2013 émis par le DSAHR, 25 % des vaches réformées le seraient pour cette raison. Cela permet de déduire que la ZON à laquelle l'hypercétionémie est susceptible d'être imputable et peut-être aussi partiellement responsable du taux élevé de réforme.

En règle générale, les seuils de tolérance (ou la limite acceptable de mycotoxines dans l'alimentation qui ne cause pas de perte de production et qui n'a pas d'impact apparent sur la santé des animaux) chez les bovins laitiers en lactation recommandés au Canada sont de 1 ppm pour le DON et de 10 ppm (1,5 ppm si d'autres toxines sont présentes) pour la ZON (Charmley et Trenholm, 2000). Ces seuils sont en contradiction avec les résultats de la présente étude, laquelle indique que pour le DON, le seuil à risque minimal est de 3,21 ppm et que pour la ZON, il est de 0,09 ppm. Certes, il est difficile d'établir des seuils de tolérance pour les mycotoxines en alimentation bovine puisque plusieurs facteurs sont à prendre en considération pour évaluer les effets nocifs de ces toxines. La mycotoxinogénèse varie en fonction de la présence éventuelle d'autres mycotoxines et des interactions susceptibles de se produire entre elles, du statut immunitaire de l'animal, des doses qu'il ingère, de son état de santé, de son stade physiologique et de la durée d'exposition (Yiannikouris et Jouany, 2002). Les seuils sont souvent établis par rapport à une seule mycotoxine (Charmley et Trenholm, 2000). Toutefois, cette étude est l'une des premières à quantifier les mycotoxines aux niveaux alimentaire, sérique et urinaire dans un contexte réel de fermes laitières avec des aliments contaminés naturellement.

La présente recherche a permis d'identifier des concentrations tolérables de DON et de ZON (et son métabolite  $\beta$ -ZOL) aux niveaux alimentaire et urinaire. Une concentration alimentaire de DON de 3,21 ppm ou moins serait le seuil à viser pour éviter les problèmes de santé chez les vaches laitières. Pour ce qui est de la ZON, l'étude suggère une concentration

alimentaire inférieure à 0,09 ppb et une concentration urinaire inférieure à 2,70 ppb pour éviter les problèmes de santé et de reproduction chez les vaches en lactation. Dans le même ordre d'idées, pour la  $\beta$ -ZOL, c'est une concentration urinaire de 6,23 ppb ou moins qui pourrait empêcher la perte de production laitière et la réforme hâtive.

L'application de ces seuils permettrait d'identifier des situations à haut risque de problèmes de santé, de production et de reproduction chez les vaches en lactation. Cette nouvelle information devrait encourager les vétérinaires et les nutritionnistes à réviser et à ajuster les recommandations qu'ils font aux producteurs laitiers.

## **Conclusion**

La quantification des mycotoxines dans l'aliment et les fluides biologiques a été réalisée grâce aux méthodes chromatographiques. Ces méthodes ouvrent la porte à une nouvelle approche diagnostique basée sur une corrélation entre les principaux symptômes d'une mycotoxicose et la concentration de la toxine retrouvée dans l'aliment et les fluides biologiques des animaux. Notre recherche a trouvé des concentrations à risque pour le DON et la ZON dans l'aliment et l'urine des bovins laitiers qui sont bel et bien associées à des impacts négatifs sur la santé, la production et la reproduction des vaches laitières. Ces résultats pourraient être utilisés en tant que bases pour l'établissement de concentrations de référence, ce qui faciliterait éventuellement la gestion des mycotoxicoses sur les fermes laitières.

## **Remerciements**

Nous tenons à remercier le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (Programme de soutien à l'innovation en agriculture) pour sa précieuse contribution financière pour ce projet d'étude (Numéro: PSIA 811125). Nous exprimons notre gratitude aux producteurs laitiers impliqués dans ce projet de recherche. Sans cette précieuse collaboration, ce projet n'aurait guère vu le jour. Nous remercions aussi Mme Marie-Claude Gendron et M. Jean-Philippe Pelletier pour le support technique qu'ils ont apporté au projet.

## Listes des références

Binder, E., L. Tan, L. Chin, J. Handl et J. Richard. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):265-282.

Boudra, H. 2009. Mycotoxins: an insidiously menacing factor for the quality of forages and the performances of the ruminants. *Fourrages* (199):265-280.

Charmley, E., H. Trenholm, B. Thompson, D. Vudathala, J. Nicholson, D. Prelusky et L. Charmley. 1993. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *Journal of Dairy Science* 76(11):3580-3587.

Charmley, L. L. et H. L. Trenholm. 2000. Fiche de renseignements - Les mycotoxines. Accédé le 29 août 2016. <http://www.inspection.gc.ca/animaux/aliments-du-betail/directives-reglementaires/rg-8/fra/1347383943203/1347384015909?chap=1>.

Coppock, R., M. Mostrom, C. Sparling, B. Jacobsen et S. Ross. 1990. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Veterinary and Human Toxicology* 32(3):246-248.

D'mello, J., C. Placinta et A. Macdonald. 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80(3):183-205.

Diaz, D., W. Hagler Jr, B. Hopkins, R. Patton, C. Brownie et L. Whitlow. 2001. The effect of inclusion of a clay type sequestering agent on milk production of dairy cattle consuming mycotoxins contaminated feeds. *Journal of Dairy Science* 84:1554.

Diaz, D., B. Hopkins, L. Leonard, W. Hagler Jr et L. Whitlow. 2000. Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83(1171):138-150.

Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton et S. LeBlanc. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93(12):5764-5771.

Fink-Gremmels, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants* 25(2):172-180.

Fink-Gremmels, J. et H. Malekinejad. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):326-341.

Fourichon, C., H. Seegers et X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53(9):1729-1759.

Gallo, A., G. Giuberti, J. C. Frisvad, T. Bertuzzi et K. F. Nielsen. 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins* 7(8):3057-3111.

Hammon, D., I. Evjen, T. Dhiman, J. Goff et J. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113(1):21-29.

Ingalls, J. 1996. Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 60(3):297-300.

Jouany, J. 2005. Effects of mycotoxins in ruminants. Pages 295-321 in *The mycotoxin blue book*. D. Diaz, ed. Nottingham University Press.

Kallela, K. et E. Ettala. 1983. The oestrogenic *Fusarium* toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nordisk Veterinaermedicin* 36(9-10):305-309.

Khamis, Y., H. A. Hammad et N. A. Hemeida. 1986. Mycotoxicosis with oestrogenic effect in cattle. *Zuchthygiene* 21(5):233-236.

Morgavi, D. et R. Riley. 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):201-212.

Pestka, J. J. 2007. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):283-298.

Pohland, A. 1993. Mycotoxins in review. *Food Additives and Contaminants* 10(1):17-28.

Prelusky, D. B., R. M. Warner et H. L. Trenholm. 1989. Sensitive analysis of the mycotoxin zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 494:267-277.

Songsermsakul, P., G. Sontag, M. Cichna-Markl, J. Zentek et E. Razzazi-Fazeli. 2006. Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC–APCI–MS. *Journal of Chromatography B* 843(2):252-261.

Trenholm, H., B. Thompson, K. Martin, R. Greenhalgh et A. McAllister. 1985. Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 68(4):1000-1005.

Usleber, E., V. Renz, E. Märtlbauer et G. Terplan. 1992. Studies on the Application of Enzyme Immunoassays for the *Fusarium* Mycotoxins Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, and Zearalenone. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 39(1-10):617-627.

Valenta, H., S. Dänicke et S. Döll. 2003. Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column. *Mycotoxin Research* 19(1):51-55.



Weaver, G., H. Kurtz, J. Behrens, T. Robison, B. Seguin, F. Bates et C. Mirocha. 1986. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research* 47(6):1395-1397.

Whitlow, L. W. et W. M. Hagler, Jr. 2008. Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. Pages 195-209 in *Advances in dairy technology : proceedings of the 2008 Western Canadian Dairy Seminar*. Vol. 20, Red Deer, Alberta, Canada.

Whitlow, L. W., R. L. Nebel et W. M. Hagler. 1994. The Association of Deoxynivalenol in Grain with Milk Production Loss in Dairy Cows. Pages 131-139 in *Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*. G. C. Llewellyn, W. V. Dashek, and C. E. O'Rear, ed. Springer US, Boston, MA.

Winkler, J., S. Kersten, U. Meyer, U. Engelhardt et S. Dänicke. 2014. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed *Fusarium* contaminated maize and their relationships to performance parameters. *Food and Chemical Toxicology* 65:196-204.

Yiannikouris, A. et J.-P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51(2):81-99.

## Discussion générale

L'industrie laitière doit continuellement s'accommoder de la présence de mycotoxines dans les rations alimentaires dont elle nourrit les vaches, notamment depuis que les producteurs servent de plus en plus de matières sèches à leurs vaches afin que celles-ci produisent de plus en plus de lait. Cette réalité n'est pas sans effets sur la santé et la performance des vaches laitières, même s'il demeure très difficile de déterminer le seuil au-delà duquel la présence de ces mycotoxines commence à poser de réelles difficultés. Les pertes économiques induites par leurs présences au monde s'élèveraient à quelques 5 milliards de dollars si l'on tient compte des dommages causés à la fois aux cultures et aux élevages (Bhat et coll., 1999).

Au Québec par exemple, le déoxynivalénol (DON) et la zéaralénone (ZON) sont considérés comme étant les mycotoxines les plus présentes dans l'alimentation des bovins laitiers. Les pertes causées par le DON se traduiraient par une baisse de la consommation d'aliments et des performances de croissance ainsi qu'une altération des fonctions immunitaires et de reproduction (Etienne et Wache, 2008). Les déficits associés au DON s'élevaient à 655 millions de dollars par année (Schmale et Munkvold, 2009). Cependant, les dommages occasionnés par la ZON seraient essentiellement liés à l'infertilité des animaux.

Sur la base de ces constatations, deux objectifs principaux ont été définis dans le cadre de la présente étude. Il s'agissait tout d'abord de procéder à la quantification des mycotoxines DON et ZON et de leurs métabolites dans les aliments et les liquides physiologiques moyennant des techniques chromatographiques. C'est à la suite de cette étape qu'il a été possible de confirmer que l'utilisation de l'approche chromatographique dans la quantification des mycotoxines DON et ZON et de leurs métabolites dans le sérum et l'urine du bovin laitier était capable de donner des résultats les plus tangibles qui soient. La seconde étape, qui consistait à établir des seuils de concentrations à risque en mycotoxines DON et ZON aux niveaux alimentaire, sérique et urinaire, a révélé que ces seuils étaient associés à des impacts négatifs sur la santé et la reproduction des vaches laitières dans des conditions réelles d'élevage. À

l'issue de la présente recherche, il a été possible d'établir six seuils de concentrations associés à une augmentation des risques de réforme, d'avortement, de baisse de performance en reproduction, d'hypercétonémie, d'endométrite clinique et de baisse de production laitière.

Il convient toutefois de rappeler qu'à aucun moment de la présente étude, il n'a été envisageable de détecter à la fois du DON et de la ZON (ainsi que leurs métabolites respectifs) dans un même échantillon d'urine ou de sérum des vaches. C'est la raison pour laquelle le seuil à risque du DON n'est évoqué qu'au niveau de l'aliment, celui de la ZON, qu'au niveau de l'aliment et de l'urine et, enfin, celui du  $\beta$ -ZOL, qu'au niveau de l'urine, entre autres pour des raisons vraisemblablement liées aux limites de détection et de sensibilité analytique de la méthode employée. De ce fait, il est intéressant de noter que le DON est quantifié uniquement au niveau de l'aliment, le DOM-1 est quant à lui mesuré au niveau sérique. L'étude de Seeling et coll; (2006) a effectivement démontré que le DOM-1 était détectable à des concentrations variant entre 4 et 28 ng/ml dans le sérum, alors que la présence de DON n'a pas été révélée par les tests par haute performance chromatographie en phase liquide (HPLC). Effectivement, cela voudrait possiblement démontrer que les concentrations de celui-ci étaient inférieures aux limites de détection de ces tests. Ces résultats sont en accord avec ceux de la présente étude, où les seuils de risque pour le DON n'ont pu être détectés au niveau sérique. En plus, l'absence du seuil à risque du DON au niveau sérique est associée à sa biotransformation en DOM-1, lequel ne serait pas toxique (Seeling et coll., 2006, Dänicke et Brezina, 2013, Winkler et coll., 2014a). Pour ce qui est de la ZON et ses métabolites, quantifiés au niveau de l'aliment et de l'urine tel que précité, il est intéressant de constater que les résultats obtenus dans la présente étude ne sont pas loin de rappeler ceux d'une étude réalisée sur des taurillons en croissance lors de laquelle les chercheurs n'avaient guère réussi à retracer les résidus de ZON et de ses métabolites dans le sang (Winkler et coll., 2016). Cela rejoint les recommandations de la présente étude où il est recommandé de recourir à l'analyse urinaire pour évaluer le niveau d'exposition des animaux à la ZON, puisque l'urine semble être un meilleur reflet de cette exposition que ne l'est le sérum.

Au cours de la présente étude, il a été constaté qu'il n'existait pas de corrélation évidente entre l'exposition des bovins laitiers au DON et à la ZON identifiés dans la ration alimentaire et les taux de concentration retrouvés aux niveaux sérique et urinaire. La corrélation la plus plausible était celle reliant la concentration du DON au niveau alimentaire et le DOM-1 au niveau sérique où le  $R^2 = 0.23$ ; alors que les autres corrélations se limitaient à un pourcentage négligeable (la corrélation ZON dans aliment versus ZON dans l'urine  $R^2 = 0,146$ ; la corrélation ZON dans aliment versus  $\beta$ -ZON dans l'urine  $R^2 = 0,084$ ; la corrélation  $\beta$ -ZON dans aliment versus  $\beta$ -ZON dans l'urine  $R^2 = 0,07$  ; la corrélation ZON dans aliment versus  $\alpha$ -ZOL urine  $R^2 = 0,006$ ; la corrélation  $\alpha$ -ZOL dans aliment versus  $\alpha$ -ZOL urine  $R^2 = 0,006$ ). Selon Danicke et Winkler (2015), cette variation serait largement influencée par le temps de rétention des aliments dans le rumen et donc de l'intervalle de temps dont les bactéries disposeraient pendant la digestion ruminale. On pourrait ainsi supposer que la variation aléatoire des quantités consommées et des quantités retrouvées aux niveaux urinaire et sanguin serait l'un des facteurs limitant la capacité d'établir la corrélation souhaitée.

Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que les mycotoxines ne sont pas uniformément réparties dans les aliments destinés aux animaux d'élevage (Whitlow et Hagler, 2001). Ainsi, leur concentration est inégale et variable, même s'il est indéniable qu'elles prolifèrent le plus souvent dans les milieux propices au développement des moisissures. De ce fait, la détermination précise des concentrations de mycotoxines dans les aliments dépend essentiellement de la pertinence de l'échantillon représentatif. Dans le cadre de la présente étude, toutes les mesures accessibles visant à assurer cette pertinence ont été prises. Ainsi, les échantillons étaient prélevés dans une ration convenablement mélangée avant que celle-ci ne soit servie aux vaches. Ils étaient conservés et acheminés dans des conditions rigoureuses pour éviter toute prolifération. Cependant, l'obtention d'un échantillon strictement représentatif ne peut être garantie dès lors que le processus s'appuie sur des graines entières ou insuffisamment mélangées de l'aliment ou du lot d'aliments. C'est ainsi que dans une proportion pouvant atteindre 90 % des cas, les erreurs diagnostiques des mycotoxicoses sont imputables à des défauts d'échantillonnage (Whitlow et Hagler, 2001). De ce fait, un aliment

contaminé par une mycotoxine ne reflète pas la réelle concentration de la toxine au niveau des liquides physiologiques. Étant donné que l'analyse des mycotoxines dans les aliments est une méthode de diagnostic difficile et souvent imparfaite, il s'avère plus pertinent de doser les mycotoxines à partir de fluides biologiques des animaux pour obtenir un meilleur diagnostic des mycotoxicoses.

Survient à présent l'épineuse question des effets synergiques, additifs ou antagonistes d'une exposition simultanée à un large éventail de mycotoxines différentes. Les types d'interactions possibles produisent soit un effet plus conséquent, il s'agit dans ce cas d'une interaction synergique, soit un effet moindre, il s'agit alors d'une interaction antagoniste. Il convient aussi de tenir compte de divers autres facteurs, notamment de la topologie des mycotoxines présentes dans les lieux, de la température, de l'état de l'animal (un animal sous stress environnemental présentant des symptômes plus marqués (Bacon, 1995)), et ainsi de suite. De plus, il est nécessaire de prendre en compte les nouvelles mycotoxines que l'on découvre au fil du temps; celles-ci sont susceptibles de contredire des connaissances jusque-là jugées établies et nécessitent un ajustement des seuils de tolérance dans la réglementation (Alassane-Kpembi et coll., 2016). Dans le cadre d'un travail récemment réalisé sur les interactions des effets cytotoxiques du DON, du NIV, de la ZON et du FB1 dans les cellules épithéliales du jéjunum de porc, les seuils de toxicité ont été mesurés pour chaque mycotoxine puis par combinaisons de 2, 3 et 4 mycotoxines. Les chercheurs ont découvert 44 combinaisons possibles pour chaque toxine avec des concentrations différentes. Ainsi, Il serait déraisonnable de ne pas s'inquiéter des conséquences que ces combinaisons complexes et multiples pourraient avoir sur la santé et la sécurité des animaux, puisqu'il apparaît évident que la présence de multiples toxines peut totalement modifier les seuils de toxicité. Cette approche peut contribuer à définir ou à optimiser les limites maximales de mycotoxines dans les denrées alimentaires destinées aux humains et aux animaux.

Le présent travail de recherche ne tient pas compte des effets synergiques entre le DON et la ZON parce que celles-ci ne relevaient pas du devis initial du projet. Il convient toutefois de rappeler qu'aucune étude connue à ce jour n'a décrit d'effets antagonistes entre ces deux

mycotoxines et que tous les travaux s'accordent à dire qu'elles sont synergiques (Alassane-Kpembi et coll., 2016). Pour les études à venir, il pourrait s'avérer plus pertinent de connaître la topographie des lieux où les mycotoxines sont présentes ou en voie d'émergence et de considérer dans le design des dites études l'effet synergique, additif ou antagoniste des différentes mycotoxines de contamination dans des conditions naturelles. Cela permettrait d'affiner la réglementation sur les limites acceptables des concentrations des mycotoxines dans les denrées alimentaires.

Il va de soi que l'étude s'est déroulée dans des conditions avantageuses puisque les producteurs laitiers qui y ont volontairement pris part ne sauraient être que soucieux du bien-être et de la santé de leurs animaux. Un même projet réalisé en d'autres lieux (où le taux de toxicité aurait été plus élevé) et dans d'autres conditions (sur des fermes moins attentives à la salubrité) aurait pu donner des résultats différents de ceux auxquels nous sommes parvenus. Ajoutons à cela que des contraintes économiques nous ont empêchés de prélever davantage d'échantillons. Nous acceptons que la présente étude n'ait pu aller au-delà de ces limitations.

La surveillance des mycotoxicoses est parfois effectuée par les médecins vétérinaires au moyen de pools sériques ou urinaires (mise en commun simultanée du sérum ou de l'urine de plusieurs vaches en vue d'obtenir la valeur moyenne du groupe). Les résultats du présent travail de recherche découlent quant à eux de tests effectués individuellement sur chaque animal et ne sont pas le produit de l'analyse d'un pool de fluides biologiques. Il n'est pas certain que les seuils à risque identifiés dans la présente étude auraient été similaires si le testage avait été réalisé moyennant le pool d'un groupe de vaches. Ainsi, en cas de suspicion de mycotoxicoses, il pourrait être préconisé de procéder tout d'abord à une analyse au niveau de l'aliment pour estimer l'exposition des animaux à ces mycotoxicoses. Cependant cette approche implique un échantillonnage représentatif de tous les ingrédients utilisés dans la ration, sinon il faut recourir à une analyse ciblée sur chaque animal. Cette approche est certes plus onéreuse, mais elle a le mérite de produire des résultats plus précis et donc plus valides.

Il est important de poursuivre les travaux de recherche visant à perfectionner les méthodes d'analyse des mycotoxines dans l'aliment et les liquides biologiques. Ces méthodes permettront de détecter des quantités infimes de mycotoxines et de définir avec plus de précision les doses à risque. Ces futures études devraient permettre d'affiner la législation sur les mycotoxines et de développer des tests qui peuvent identifier et quantifier plusieurs mycotoxines à la fois, et ce à un prix abordable. Des chercheurs du monde entier poursuivent leurs travaux en vue d'améliorer les connaissances et les outils de diagnostic liés aux mycotoxicoses, comme l'illustre l'élaboration de la chromatographie HPLC/MS/MS, la synergie entre différentes mycotoxines, un échantillon le plus représentatif ect. Néanmoins, il faut garder à l'esprit qu'il revient principalement aux éleveurs, aux vétérinaires et à l'industrie agroalimentaire de lutter contre ces toxines et leur prolifération.

## Conclusion générale

La présente étude a permis de quantifier les mycotoxines DON et ZON dans l'aliment, l'urine et le sérum des bovins laitiers confirmant ainsi les thèses ultérieurement avancées à la suite d'autres études et de quantifier les seuils à risque pour certaines maladies grâce à la chromatographie. Elle a également permis de mettre en avant six concentrations de mycotoxines responsables de l'augmentation du risque de réforme, d'avortement, de baisse de la reproduction, d'hypercétonémie, d'endométrite clinique et de baisse de la production laitière. Ces concentrations ouvrent la porte à une nouvelle approche diagnostique basée sur une corrélation entre les principaux symptômes d'une mycotoxicose et la concentration de la toxine retrouvée dans l'aliment et les fluides biologiques des animaux. La surveillance de la présence et la concentration de ces mycotoxines dans l'aliment et l'urine des bovins laitiers devrait permettre de mieux gérer leur présence et leurs conséquences négatives sur la santé, la production et la reproduction. Ces résultats pourraient être utilisés en tant que bases pour l'établissement des concentrations de références, ce qui faciliterait éventuellement la gestion des mycotoxicoses sur les fermes laitières.



## Références bibliographiques

Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments. 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale : rapport final. France.

Agag, B. 2005. Mycotoxins in foods and feeds 5-Trichothecenes AT-2 Toxin. Assiut University Bulletin for Environmental Researches. 8(2):641-645.

Alassane-Kpembé, I., G. Schatzmayr, I. Taranu, D. Marin, O. Puel et I. P. Oswald. 2016. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. Critical Reviews in Food Science and Nutrition :00-00.

Applebaum, R. S., R. E. Brackett, D. W. Wiseman et E. H. Marth. 1982. Aflatoxin: toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and milk products-a review. Journal of Food Protection 45(8):752-777.

Applegate, T., G. Schatzmayr, K. Prickett, C. Troche et Z. Jiang. 2009. Effect of aflatoxin culture on intestinal function and nutrient loss in laying hens. Poultry Science 88(6):1235-1241.

Azcona-Olivera, J., Y.-L. Ouyang, R. Warner, J. Linz et J. Pestka. 1995. Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) and cycloheximide on IL-2, 4, 5 and 6 secretion and mRNA levels in murine CD4+ cells. Food and Chemical Toxicology 33(6):433-441.

Azconaolivera, J. I., Y. Ouyang, J. Murtha, F. S. Chu et J. J. Pestka. 1995. Induction of cytokine mRNAs in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. Toxicology and Applied Pharmacology 133(1):109-120.

Bacon, C. W. 1995. Toxic endophyte-infected tall fescue and range grasses: historic perspectives. Journal of Animal Science 73(3):861-870.

Banotai, C., D. Greene-McDowelle, J. Azcona-Olivera et J. Pestka. 1999. Effects of intermittent vomitoxin exposure on body weight, immunoglobulin levels and haematuria in the B6C3F 1 mouse. *Food and Chemical Toxicology* 37(4):343-350.

Bennett, J. W. et M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3):497-516.

Berthiller, F., C. Dall'Asta, R. Corradini, R. Marchelli, M. Sulyok, R. Krska, G. Adam et R. Schuhmacher. 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its 3- $\beta$ -D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants* 26(4):507-511.

Beuchat, L. R. 1983. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection* 46(2):135-141.

Bhat, R. V., F. Joint et S. Vasanthi. 1999. Mycotoxin contamination of foods and feeds: an overview. in *International Conference on Mycotoxins*, 3-6 Mar. Tunis (Tunisia).

Binder, E., L. Tan, L. Chin, J. Handl et J. Richard. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):265-282.

Boudra, H. 2009. Mycotoxins: an insidiously menacing factor for the quality of forages and the performances of the ruminants. *Fourrages* (199):265-280.

Bouslimi, A., C. Bouaziz, I. Ayed-Boussema, W. Hassen et H. Bacha. 2008. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. *Toxicology* 251(1):1-7.

Brochard, G. et C. Le Bacle. 2009. Mycotoxines en milieu de travail. *Institut national de la recherche scientifique Université à Québec, Canada* 119(3):299-323.

Bryden, W. L. 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 173(1):134-158.

Castegnaro, M. et D. McGregor. 1998. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire (France)* 149:671–678.

Charmley, E., H. Trenholm, B. Thompson, D. Vudathala, J. Nicholson, D. Prelusky et L. Charmley. 1993. Influence of level of deoxynivalenol in the diet of dairy cows on feed intake, milk production, and its composition. *Journal of Dairy Science* 76(11):3580-3587.

Charmley, L. L. et H. L. Trenholm. 2000. Fiche de renseignements - Les mycotoxines. Accédé le 29 août 2016. <http://www.inspection.gc.ca/animaux/aliments-du-betail/directives-reglementaires/rg-8/fra/1347383943203/1347384015909?chap=1>.

Chen, F., Y. Ma, C. Xue, J. Ma, Q. Xie, G. Wang, Y. Bi et Y. Cao. 2008. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. *Journal of Veterinary Science* 9(1):39-44.

Coppock, R., M. Mostrom, C. Sparling, B. Jacobsen et S. Ross. 1990. Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn. *Veterinary and Human Toxicology* 32(3):246-248.

Côté, L.-M., A. Dahlem, T. Yoshizawa, S. Swanson et W. Buck. 1986. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 69(9):2416-2423.

Creppy, E. E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127(1):19-28.

Creppy, E. E., P. Chiarappa, I. Baudrimont, P. Borracci, S. Moukha et M. R. Carratù. 2004. Synergistic effects of fumonisin B 1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology* 201(1):115-123.

D'mello, J., C. Placinta et A. Macdonald. 1999. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80(3):183-205.

Dänicke, S. et U. Brezina. 2013. Kinetics and metabolism of the Fusarium toxin deoxynivalenol in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. *Food and chemical toxicology* 60:58-75.

Diaz, D., W. Hagler Jr, B. Hopkins, R. Patton, C. Brownie et L. Whitlow. 2001. The effect of inclusion of a clay type sequestering agent on milk production of dairy cattle consuming mycotoxins contaminated feeds. *Journal of Dairy Science* 84:1554.

Diaz, D., B. Hopkins, L. Leonard, W. Hagler Jr et L. Whitlow. 2000. Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83(1171):138-150.

Diaz, D. E. 2005. *The mycotoxin blue book*. Vol. 350 pages. Nottingham University Press.

Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton et S. LeBlanc. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93(12):5764-5771.

Eaton, D. L. et E. P. Gallagher. 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34(1):135-172.

Ehrlich, K. C. et K. W. Daigle. 1987. Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12, 13-epoxytrichothecenes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 923(2):206-213.

Eriksen, G. S., H. Pettersson et J. Lindberg. 2003. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Archives of Animal Nutrition* 57(5):335-345.

Etienne, M. et Y. Wache. 2008. Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig. Pages 113-130. I. P. Oswald and I. Taranu, ed. *Transworld Research Network, Trivandrum*.

Everett, D., C. Perry, K. Scott, B. Martin et M. Terry. 1987. Estrogenic potencies of resorcylic acid lactones and 17 $\beta$ -estradiol in female rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 20(4):435-443.

Fink-Gremmels, J. 2008. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants* 25(2):172-180.

Fink-Gremmels, J. et H. Malekinejad. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):326-341.

Fink-Gremmels, J. 1999. Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly* 21(4):115-120.

Fitzgerald, J., R. Collin et N. Towers. 1998. Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. *Letters in Applied Microbiology* 26(1):17-21.

Foster, B., H. Trenholm, D. Friend, K. Hartin et B. THOMPSON. 1986. Evaluation of different sources of deoxynivalenol (vomitoxin) fed to swine. *Canadian Journal of Animal Science* 66(4):1149-1154.

Fourichon, C., H. Seegers et X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53(9):1729-1759.

Frizzell, C., D. Ndossi, S. Verhaegen, E. Dahl, G. Eriksen, M. Sørli, E. Ropstad, M. Muller, C. Elliott et L. Connolly. 2011. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters* 206(2):210-217.

Fushimi, Y., M. Takagi, H. Hasunuma, S. Uno, E. Kokushi, U. Watanabe, J. Liu, M. Marey, A. Miyamoto et T. Otoi. 2014. Application of mycotoxin adsorbent to cattle feed contaminated

with zearalenone: Urinary zearalenone excretion and association with anti-Müllerian hormone. *World Mycotoxin Journal* 7(3):367-378.

Gallo, A., G. Giuberti, J. C. Frisvad, T. Bertuzzi et K. F. Nielsen. 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins* 7(8):3057-3111.

Galtier, P. 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Revue de Medecine Veterinaire (France)* 149:549-554.

Gaumy, J., J. Bailly, G. Benard et P. Guerre. 2001a. Zéaralénone: origine et effets chez les animaux d'élevage. *Revue de Medecine Veterinaire* 152(2):123-136.

Gaumy, J., J. Bailly, V. Burgat et P. Guerre. 2001b. Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de Médecine Vétérinaire* 152(3):217-234.

Gelderblom, W., K. Jaskiewicz, W. Marasas, P. Thiel, R. Horak, R. Vleggaar et N. Kriek. 1988. Fumonisins--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54(7):1806-1811.

Golinski, P., Z. Kaczmarek, I. Kiecana, H. Wisniewska, P. Kaptur, M. Kostecki et J. Chelkowski. 2002. *Fusarium* head blight of common Polish winter wheat cultivars--comparison of effects of *Fusarium avenaceum* and *Fusarium culmorum* on yield components. *Journal of Phytopathology* 150(3):135-141.

Goyarts, T. et S. Dänicke. 2006. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicology Letters* 163(3):171-182.

Gratz, S. W., G. Duncan et A. J. Richardson. 2013. The human fecal microbiota metabolizes deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside and may be responsible for urinary deepoxy-deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology* 79(6):1821-1825.

Greenman, D. L., R. G. Mehta et J. L. Wittliff. 1979. Nuclear interaction of Fusarium mycotoxins with estradiol binding sites in the mouse uterus. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 5(4):593-598.

Gromadzka, K., A. Waskiewicz, J. Chelkowski et P. Golinski. 2008. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal* 1(2):209-220.

Hagler, W., K. Tyczkowska et P. Hamilton. 1984. Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone, and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the midwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology* 47(1):151-154.

Halewyn, M.-A. d. et M. Poulin. 2002. Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur : document synthèse. [Montréal] : Institut national de santé publique du Québec, Montréal.

Hammon, D., I. Evjen, T. Dhiman, J. Goff et J. Walters. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113(1):21-29.

Han, E.-M., R. P. HEE, S. J. HU, K.-S. Kwon, H. LEE, M.-S. Ha, K.-M. Kim, E.-J. Ko, S.-D. Ha et S. C. HYANG. 2006. Monitoring of aflatoxin B1 in livestock feeds using ELISA and HPLC. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16(4):643-646.

Heneweer, M., R. Houtman, J. Poortman, M. Groot, C. Maliepaard et A. Peijnenburg. 2007. Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach. *Toxicological Sciences* 99(1):303-314.

Hussein, H. S. et J. M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167(2):101-134.

Ingalls, J. 1996. Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 60(3):297-300.

Iordanov, M. S., D. Pribnow, J. L. Magun, T.-H. Dinh, J. A. Pearson, S. Chen et B. E. Magun. 1997. Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Molecular and Cellular Biology* 17(6):3373-3381.

Jouany, J. 2005. Effects of mycotoxins in ruminants. Pages 295-321 in *The mycotoxin blue book*. D. Diaz, ed. Nottingham University Press.

Jouany, J., A. Yiannikouris et G. Bertin. 2009. Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products . In : Papachristou TG , Parissi ZM, Ben Salem H, Morand-Fehr P,rédacteurs. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats*. Zaragoza : CIHEAM / FAO / NAGREF. p. 205-224 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 85).

Kallela, K. et E. Ettala. 1983. The oestrogenic Fusarium toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow. *Nordisk Veterinaermedicin* 36(9-10):305-309.

Karlovsy, P. 2011. Biological detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol and its use in genetically engineered crops and feed additives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(3):491-504.

Keller, S., T. Sullivan et S. Chirtel. 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19(4):305-309.

Khamis, Y., H. A. Hammad et N. A. Hemeida. 1986. Mycotoxicosis with oestrogenic effect in cattle. *Zuchthygiene* 21(5):233-236.

Kiang, D. T., B. J. Kennedy, S. Pathre et C. J. Mirocha. 1978. Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Research* 38(11 Part 1):3611-3615.



Kiessling, K.-H., H. Pettersson, K. Sandholm et M. Olsen. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47(5):1070-1073.

Klarić, M. Š., L. Rumora, D. Ljubanović et S. Pepeljnjak. 2008. Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment. *Archives of Toxicology* 82(4):247-255.

Kleinova, M., P. Zöllner, H. Kahlbacher, W. Hochsteiner et W. Lindner. 2002. Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(17):4769-4776.

Klotz, J., B. Kirch, G. Aiken, L. Bush et J. Strickland. 2008. Effects of selected combinations of tall fescue alkaloids on the vasoconstrictive capacity of fescue-naive bovine lateral saphenous veins. *Journal of Animal Science* 86(4):1021-1028.

Kuiper-Goodman, T., P. Scott et H. Watanabe. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 7(3):253-306.

Kuo, C., D. Taub, R. Hoffsommer, N. Wendler, W. Urry et G. Mullenbach. 1967. The resolution of ( $\pm$ )-zearalenone. Determination of the absolute configuration of the natural enantiomorph. *Chemical Communications (London)* (15):761-762.

Langseth, W., R. H $\odot$ ie et M. Gullord. 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in Norwegian oats 1985–1990. *Acta Agriculturae Scandinavica B-Plant Soil Sciences* 45(1):63-67.

Le Bars, J. et P. Le Bars. 1987. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. in Proc. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section Midi-Pyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987, (cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l'Institut Pasteur, 4e trimestre 1987).

Li, F.-Q., Y.-W. Li, X.-Y. Luo et T. Yoshizawa. 2002. Fusarium toxins in wheat from an area in Henan Province, PR China, with a previous human red mould intoxication episode. *Food Additives and Contaminants* 19(2):163-167.

Lipps, P. et I. Deep. 1991. Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot, and recovery of Fusarium and Trichoderma spp. from corn. *Plant disease* 75(8):828-833.

Liu, J., S. Zanardi, S. Powers et M. Suman. 2012. Development and practical application in the cereal food industry of a rapid and quantitative lateral flow immunoassay for deoxynivalenol. *Food Control* 26(1):88-91.

Liu, Y., C.-z. Zhang, X.-y. Yu, Z.-y. Zhang, X. Zhang, R.-r. Liu, X.-j. Liu et Z.-m. Gong. 2007. Development and evaluation of immunoassay for zearanol in bovine urine. *Journal of Zhejiang University Science B* 8(12):900-905.

Luongo, D., L. Severino, P. Bergamo, R. De Luna, A. Lucisano et M. Rossi. 2006. Interactive effects of fumonisin B1 and  $\alpha$ -zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells. *Toxicology in Vitro* 20(8):1403-1410.

Magan, N. et D. Aldred. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119(1–2):131-139.

Magan, N. et J. Lacey. 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82(1):83-93.

Male, D., N. Mitchell, W. Wu, S. Bursian, J. Pestka et F. Wu. 2016. Modelling the anorectic potencies of food-borne trichothecenes by benchmark dose and incremental area under the curve methodology. *World Mycotoxin Journal* 9(2):279-288.

Malekinejad, H., R. Maas-Bakker et J. Fink-Gremmels. 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal* 172(1):96-102.

Marasas, W. F., T. S. Kellerman, W. C. Gelderblom, J. A. Coetzer, P. G. Thiel et J. J. van der Lugt. 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55(4):197-203.

Maresca, M. 2013. From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* 5(4):784-820.

Marin, S., V. Sanchis, I. Vinas, R. Canela et N. Magan. 1995. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Letters in Applied Microbiology* 21(5):298-301.

McKean, C., L. Tang, M. Billam, M. Tang, C. W. Theodorakis, R. J. Kendall et J. S. Wang. 2006. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. *Journal of Applied Toxicology* 26(2):139-147.

Meyer, K., E. Usleber, R. Dietrich, E. Martlbauer et J. Bauer. 2002. Zearalenone metabolites in bovine bile. *Archiv Für Lebensmittelhygiene* 53(5):115-117.

Miller, J. 1994. Conference Report: 6 th International Working Conference on Stored-product Protection. *Australian Mycotoxin Newsletter* 5(2):1-8.

Mirocha, C., J. Harrison, A. A. Nichols et M. McClintock. 1968. Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Applied microbiology* 16(5):797.

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

Moon, Y. et J. J. Pestka. 2002. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicological Sciences* 69(2):373-382.

Morgavi, D. et R. Riley. 2007. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):201-212.

Morooka, N., N. Uratsuji, T. Yoshizawa et H. Yamamoto. 1972. Studies on the Toxic Substances in Barley Infected with *Fusarium* spp. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* 13(5):368-375.

Moss, M. et J. Frank. 1985. Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society* 84(4):585-590.

Nagl, V., H. Schwartz, R. Krska, W.-D. Moll, S. Knasmüller, M. Ritzmann, G. Adam et F. Berthiller. 2012. Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in rats. *Toxicology Letters* 213(3):367-373.

Nathanail, A. V., J. Syvähuoko, A. Malachová, M. Jestoi, E. Varga, H. Michlmayr, G. Adam, E. Sieviläinen, F. Berthiller et K. Peltonen. 2015. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(16):4745-4755.

Nesbitt, B. F., J. O'Kelly, K. Sargeant et A. Sheridan. 1962. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature, London* 195(4846):1062-1063.

Osweiler, G., M. Kehrli, J. Stabel, J. Thurston, P. Ross et T. Wilson. 1993. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *Journal of Animal Science* 71(2):459-466.

Ouyang, Y. L., J. I. Azcona-Olivera, J. Murtha et J. J. Pestka. 1996. Vomitoxin-mediated IL-2, IL-4, and IL-5 superinduction in murine CD4+ T cells stimulated with phorbol ester and calcium ionophore: relation to kinetics of proliferation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 138(2):324-334.

Pan, X., D. A. Whitten, M. Wu, C. Chan, C. G. Wilkerson et J. J. Pestka. 2013. Global protein phosphorylation dynamics during deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response in the macrophage. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268(2):201-211.

Pardo, E., U. Lagunas, V. Sanchis, A. J. Ramos et S. Marín. 2005. Influence of water activity and temperature on conidial germination and mycelial growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on grape juice synthetic medium. Predictive models. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(10):1681-1686.

Peraica, M., B. Radic, A. Lucic et M. Pavlovic. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization* 77(9):754-766.

Pestka, J. J. 2007. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):283-298.

Pestka, J. J. et A. T. Smolinski. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. Critical Reviews* 8(1):39-69.

Pestka, J. J., I. Yike, D. G. Dearborn, M. D. W. Ward et J. R. Harkema. 2008. *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: new insights into a public health enigma. *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology* 104(1):4.

Pestka, J. J., H.-R. Zhou, Y. Moon et Y. Chung. 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicology Letters* 153(1):61-73.

Pitt, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56(1):184-192.

Pleadin, J., A. Vulić, N. Perši, M. Škrivanko, B. Capek et Ž. Cvetnić. 2014. Aflatoxin B 1 occurrence in maize sampled from Croatian farms and feed factories during 2013. *Food Control* 40:286-291.

Pohland, A. 1993. Mycotoxins in review. *Food Additives and Contaminants* 10(1):17-28.

Porter, J., E. Wray, R. Eppley et W. Hagler Jr. 1998. Zearalenone and fusaric acid in the diet of nursing dams enhances both mycotoxins' lactational transfer to the suckling neonate. Pages 13-17 in *Proc. 112th AOAC International Annual Meeting and Exposition, Montréal, Québec, Canada, Sept.*

Prelusky, D., P. Scott, H. Trenholm et G. Lawrence. 1990. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows 1. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 25(1):87-103.

Prelusky, D., H. Trenholm, G. Lawrence et P. Scott. 1984. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 19(7):593-609.

Prelusky, D., D. Veira, H. Trenholm et B. Foster. 1987a. Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep 1. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 22(2):125-148.

Prelusky, D. B., H. L. Trenholm, R. M. Hamilton et J. D. Miller. 1987b. Transmission of [<sup>14</sup>C] deoxynivalenol to eggs following oral administration to laying hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35(2):182-186.

Prelusky, D. B., R. M. Warner et H. L. Trenholm. 1989. Sensitive analysis of the mycotoxin zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 494:267-277.

Rajendran, S. 2005. Detection of insect infestation in stored foods. *Advances in Food and Nutrition Research* 49:163-232.

Reboux, G. 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 46(3):208-212.

Ribeiro, J., L. Cavaglieri, M. Fraga, G. Direito, A. Dalcero et C. Rosa. 2006. Influence of water activity, temperature and time on mycotoxins production on barley rootlets. *Letters in Applied Microbiology* 42(2):179-184.

Richard, J., G. Payne, eds, A. Desjardins, C. Maragos, W. Norred et J. Pestka. 2003. *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems*. Council for Agricultural Science and Technology Task Force Report 139:101-103.

Rotter, B., B. Thompson, M. Lessard, H. Trenholm et H. Tryphonas. 1994. Influence of low-level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Toxicological Sciences* 23(1):117-124.

Rotter, B. A. 1996. Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 48(1):1-34.

Saint-Cyr, M. J., A. Perrin-Guyomard, P. Houee, J. G. Rolland et M. Laurentie. 2013. Evaluation of an oral subchronic exposure of deoxynivalenol on the composition of human gut microbiota in a model of human microbiota-associated rats. *PLoS ONE* 8(11).

Schmale, D. G. et G. P. Munkvold. 2009. Mycotoxins in crops: A threat to human and domestic animal health. *The Plant Health Instructor* 3:340-353.

Schollenberger, M., H.-M. Müller, M. Rühle, S. Suchy, S. Plank et W. Drochner. 2006. Natural Occurrence of 16 *Fusarium* Toxins in Grains and Feedstuffs of Plant Origin from Germany. *Mycopathologia* 161(1):43-52.

Schwarzer, K. 2009. Harmful effects of mycotoxins on animal physiology. in Proc. 17th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop, June 15-19, Hue, Vietnam.

Seeling, K., S. Dänicke, H. Valenta, H. Van Egmond, R. Schothorst, A. Jekel, P. Lebzien, M. Schollenberger, E. Razzazi-Fazeli et G. Flachowsky. 2006. Effects of *Fusarium* toxin-

contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Additives and Contaminants* 23(10):1008-1020.

Shier, W., A. Shier, W. Xie et C. Mirocha. 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 39(9):1435-1438.

Sinha, A. 1994. The impact of insect pests on aflatoxin contamination of stored wheat and maize. Pages 1059-1063 in *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection*. 17-23 April, Canberra, Australia.

Smith, M.-C., S. Madec, E. Coton et N. Hymery. 2016. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins* 8(4):94.

Smith, T. et E. MacDonald. 1991. Effect of fusaric acid on brain regional neurochemistry and vomiting behavior in swine. *Journal of Animal Science* 69(5):2044-2049.

Smith, T. K., E. G. McMillan et J. B. Castillo. 1997. Effect of feeding blends of *Fusarium* mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *Journal of Animal Science* 75(8):2184-2191.

Sobrova, P., V. Adam, A. Vasatkova, M. Beklova, L. Zeman et R. Kizek. 2010. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary Toxicology* 3(3):94-99.

Songsermsakul, P., G. Sontag, M. Cichna-Markl, J. Zentek et E. Razzazi-Fazeli. 2006. Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC–APCI–MS. *Journal of Chromatography B* 843(2):252-261.

Soriano, J. et S. Dragacci. 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International* 37(10):985-1000.

Speijers, G. J. A. et M. H. M. Speijers. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters* 153(1):91-98.



Sprosen, J. et N. Towers. 1995. Urinary zearalenone metabolite concentrations in herds with fertility problems. *Toxinology and Food Safety*. Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand :45-46.

Stratton, G., A. Robinson, H. Smith, L. Kittilsen et M. Barbour. 1993. Levels of five mycotoxins in grains harvested in Atlantic Canada as measured by high performance liquid chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24(3):399-409.

Sugita-Konishi, Y. et J. J. Pestka. 2001. Differential upregulation of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 64(8):619-636.

Tajima, O., E. Schoen, V. Feron et J. Groten. 2002. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food and Chemical Toxicology* 40(5):685-695.

Takagi, M., T. Hirai, S. Shiga, S. Uno, E. Kokushi, T. Otoi, E. Deguchi, C. Tshering et J. Fink-Gremmels. 2013. Relationship between urinary zearalenone concentration and embryo production in superovulated cattle. *Archiv für Tierernährung* 56:360-366.

Towers, N. et J. Sprosen. 1993. Zearalenone-induced infertility in sheep and cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 41:223-223.

Trenholm, H., B. Thompson, K. Martin, R. Greenhalgh et A. McAllister. 1985. Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 68(4):1000-1005.

Urry, W., H. Wehrmeister, E. Hodge et P. Hidy. 1966. The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters* 7(27):3109-3114.

Usleber, E., V. Renz, E. Märtlbauer et G. Terplan. 1992. Studies on the Application of Enzyme Immunoassays for the Fusarium Mycotoxins Deoxynivalenol, 3-Acetyldeoxynivalenol, and Zearalenone. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 39(1-10):617-627.

Valenta, H., S. Dänicke et S. Döll. 2003. Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column. *Mycotoxin Research* 19(1):51-55.

Van Egmond, H. P., R. C. Schothorst et M. A. Jonker. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389(1):147-157.

Vesonder, R., A. Ciegler et A. Jensen. 1973. Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn. *Applied Microbiology* 26(6):1008-1010.

Vogelgsang, S., M. Sulyok, I. Banziger, R. Krska, R. Schuhmacher et H. R. Forrer. 2008. Effect of fungal strain and cereal substrate on in vitro mycotoxin production by *Fusarium poae* and *Fusarium avenaceum*. *Food Additives and Contaminants* 25(6):745-757.

Weaver, G., H. Kurtz, J. Behrens, T. Robison, B. Seguin, F. Bates et C. Mirocha. 1986. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research* 47(6):1395-1397.

Whitaker, T., J. Dickens et F. Giesbrecht. 1991. Sampling, subsampling, and analysis Mycotoxins and Animal Foods :153-64

Whitlow, L. et W. Hagler. 2001. La contamination des aliments par les mycotoxines: un facteur de stress additionnel pour les bovins laitiers. Pages 9-30 in 25e Symposium sur les Bovins Laitiers : des défis? des solutions!, 17 octobre, Saint-Hyacinthe. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, ed, Québec, Canada.

Whitlow, L. W. et W. M. Hagler, Jr. 2008. Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. Pages 195-209 in Advances in dairy technology : proceedings of the 2008 Western Canadian Dairy Seminar. Vol. 20, Red Deer, Alberta, Canada.

Whitlow, L. W., R. L. Nebel et W. M. Hagler. 1994. The Association of Deoxynivalenol in Grain with Milk Production Loss in Dairy Cows. Pages 131-139 in Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration. G. C. Llewellyn, W. V. Dashek, and C. E. O'Rear, ed. Springer US, Boston, MA.

Winkler, J., J. Gödde, U. Meyer, J. Frahm, H. Westendarp et S. Dänicke. 2016. Fusarium toxin-contaminated maize in diets of growing bulls: effects on performance, slaughtering characteristics, and transfer into physiological liquids. *Mycotoxin Research* 32(3):127-135.

Winkler, J., S. Kersten, U. Meyer, U. Engelhardt et S. Dänicke. 2014a. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed Fusarium contaminated maize and their relationships to performance parameters. *Food and Chemical Toxicology* 65:196-204.

Winkler, J., S. Kersten, H. Valenta, L. Hüther, U. Meyer, U. Engelhardt et S. Dänicke. 2014b. Simultaneous determination of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites in bovine urine as biomarkers of exposure. *World Mycotoxin Journal* 8(1):63-74.

Winkler, J., S. Kersten, H. Valenta, U. Meyer, U. H. Engelhardt et S. Dänicke. 2015. Development of a multi-toxin method for investigating the carryover of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. *Food Additives and Contaminants: Part A* 32(3):371-380.

Wu, F. 2006. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Research* 15(3):277-289.

Wu, F. 2007. Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds. *Animal Feed Science and Technology* 137(3):363-374.

- Wu, Q., V. Dohnal, L. Huang, K. Kuča et Z. Yuan. 2010. Metabolic pathways of trichothecenes. *Drug Metabolism Reviews* 42(2):250-267.
- Yang, G.-H., B. B. Jarvis, Y.-J. Chung et J. J. Pestka. 2000. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164(2):149-160.
- Yang, J., Y. Zhang, Y. Wang et S. Cui. 2007a. Toxic effects of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicology in Vitro* 21(4):558-565.
- Yang, J. Y., G. X. Wang, J. L. Liu, J. J. Fan et S. Cui. 2007b. Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology* 24(3):381-387.
- Yiannikouris, A. et J.-P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51(2):81-99.
- Yoshizawa, T. 2013. Thirty-five years of research on deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin: with special reference to its discovery and co-occurrence with nivalenol in Japan. *Food Safety* 1(1):2013002-2013002.
- Yoshizawa, T., L.-M. Cote, S. Swanson et W. Buck. 1986. Confirmation of DOM-1, a deepoxidation metabolite of deoxynivalenol, in biological fluids of lactating cows. *Agricultural and Biological Chemistry* 50(1):227-229.
- Zhou, H.-R., A. S. Lau et J. J. Pestka. 2003. Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response. *Toxicological Sciences* 74(2):335-344.

Zinedine, A., J. M. Soriano, J. C. Molto et J. Manes. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45(1):1-18.

Zöllner, P. et B. Mayer-Helm. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136(2):123-169.