HAL
open science

Activités de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs

Vincent Niderkorn

To cite this version:

Vincent Niderkorn. Activités de biotransformation et de séquestration des fusariotoxines chez les bactéries fermentaires pour la détoxification des ensilages de maïs. Biologie végétale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. NNT : 2007CLF21729 . tel-00717731v2

HAL Id: tel-00717731

https://theses.hal.science/tel-00717731v2

Submitted on 13 Jul 2012

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U : 1729

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

N° d'ordre : 451

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE BLAISE PASCAL

Spécialité : Nutrition et Sciences des Aliments

Présentée et soutenue publiquement

Par

Vincent NIDERKORN

Le 25 janvier 2007

ACTIVITES DE BIOTRANSFORMATION ET DE SEQUESTRATION DES FUSARIOTOXINES CHEZ LES BACTERIES FERMENTAIRES POUR LA DETOXIFICATION DES ENSILAGES DE MAÏS

Président : *Pierre GALTIER*, Directeur de Recherche, INRA Toulouse

Examinateurs : *Hamid BOUDRA*, Ingénieur de Recherche, INRA Clermont-Ferrand-Theix
Henri DURAND, Directeur Scientifique, LALLEMAND SAS
Bettina ABOAB, Maître de Conférence, Université Blaise Pascal

Rapporteurs : *Florence FORGET*, Directrice de Recherche, INRA Bordeaux
Monique ZAGOREC, Directrice de Recherche, INRA Jouy en Josas

Unité de Recherche sur les Herbivores
Centre de Recherche INRA de Clermont-Ferrand-Theix

« Les abeilles pillotent deçà delà les fleurs, mais elles en font après le miel, qui est tout leur; ce n'est plus thin ny marjolaine : ainsi les pieces empruntées d'autruy, il les transformera et confondera, pour en faire un ouvrage tout sien, à sçavoir son jugement. Son institution, son travail et estude ne vise qu'à le former. »

Montaigne. *Les Essais* - Livre 1er. *De l'institution des enfants*, chapitre 26.

A Diane, Yuna et Gaëtan

A mes parents

Ce travail a été réalisé dans l'Unité de Recherche sur les Herbivores à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand-Theix. Il a été effectué dans le cadre d'une convention CIFRE dont les partenaires étaient l'INRA, l'ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) et la société Lallemand.

Je remercie le Dr. Jean-Baptiste Coulon, Directeur de thèse et Directeur de l'Unité de Recherche sur les Herbivores, ainsi que le Dr. Michel Doreau, responsable de l'équipe Digestion Microbienne et Absorption, de m'avoir accueilli au sein de l'INRA.

Je remercie les membres du jury d'avoir bien voulu porter intérêt à ce travail, et tout particulièrement le Dr. Pierre Galtier, Directeur de Recherche, INRA Toulouse, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, le Dr. Florence Forget, Directrice de Recherche, INRA Bordeaux, et le Dr. Monique Zagorec, Directrice de Recherche, INRA Jouy-en-Josas pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également les examinateurs de ce travail : le Dr. Henri Durand, Directeur Scientifique, Lallemand SAS, le Dr. Bettina Aboab, Maître de Conférence, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, et le Dr. Hamid Boudra, Ingénieur de Recherche, INRA Clermont-Ferrand-Theix.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance au Dr. Hamid Boudra, responsable de l'encadrement de cette thèse, pour sa confiance, sa patience et sa disponibilité. La façon dont il m'a guidé, conseillé et encouragé tout au long de ces trois années m'a permis de progresser et d'aboutir à la production de cette thèse.

Mes plus chaleureux remerciements vont également au Dr. Diego Morgavi, pour sa disponibilité, son expertise et la révision des articles. Ses commentaires et ses suggestions ont toujours été fort judicieux et ont enrichi ma formation.

Je remercie très vivement le Dr. Henri Durand de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions matérielles et de m'avoir fait bénéficier de ses compétences dans les domaines des ensilages et des bactéries lactiques.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres du comité de pilotage, M. Joseph Le Bars, retraité, INRA Toulouse, le Dr. Isabelle Oswald, Directrice de Recherche, INRA Toulouse, le Pr. Christiane Forestier, Université d'Auvergne, le Dr. Frédérique Chaucheras-

Durand, chercheur, Lallemand SAS, M. Julien Sindou, chef de produit, Lallemand SAS, pour le temps accordé et les conseils divulgués tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier vivement David Alvarez pour son aide précieuse et sa compétence, Jean-Pierre Jouany, Didier Macheboeuf, Bernadette Lassaras, Dominique Graviou, Bruno Meunier, Roger Bergault, Sophie Sadet, Christelle Provenchère et d'une manière plus générale tous les membres de l'équipe Digestion Microbienne et Absorption.

Je remercie Antoine Tissandier, stagiaire de Master Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université d'Auvergne pour son implication et son efficacité dans la mise en œuvre du criblage de souches.

Je tiens à remercier Christophe Monnet (Laboratoire Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA Thiverval-Grignon), Erick Casalta (Laboratoire de Recherche sur le Développement et l'Elevage, INRA Corte), Françoise Bringel (Laboratoire de Microbiologie et de Génétique, CNRS Strasbourg), Marie-Christine Montel (Unité de Recherches Fromagères, INRA Clermont-Ferrand-Theix) et Stéphanie Calvet (Lallemand SAS) pour avoir accepté de nous donner accès à leur collections de bactéries fermentaires, ainsi que Pierre Renault, Christine Delorme (Unité de Génétique Microbienne, UR1249, INRA Jouy-en-Josas) et Saulius Kulakauskas (Unité Bactéries lactiques et opportunistes, UR888, INRA Jouy-en-Josas) qui ont gentiment accepté de nous prêter un certain nombre de mutants pour l'étude du mécanisme de séquestration des fumonisines.

Je remercie Estelle Pujos et Corinne Pouyet (plateforme Métabolisme et Spectrométrie de Masse, UMR 1019, INRA Clermont-Ferrand-Theix) pour leur contribution à l'identification du produit de biotransformation de la zéaralénone par certaines souches de bactéries lactiques.

J'aimerais par ailleurs souligner la contribution importante apportée par Marielle Lemaire et Bettina Aboab (Laboratoire Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504, Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand) pour la modélisation moléculaire des fumonisines.

Enfin, je remercie Diane qui m'a accompagné et soutenu tout au long de cette période.

SOMMAIRE

Sommaire i

Liste des illustrations iv

Liste des abréviations vi

Liste des publications et communications viii

Liste des annexes x

INTRODUCTION 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I. LES FUSARIOTOXINES : STRUCTURE, TOXICITE, DEVENIR DANS L'ORGANISME 7

1. Relations structure - toxicité des principales fusariotoxines 7

1.1 Les trichothécènes 7

1.2 La zéaralénone et ses dérivés 8

1.3 Les fumonisines 9

2. Devenir des fusariotoxines dans l'organisme chez les ruminants et le porc 10

2.1 Absorption 11

2.2 Métabolisation 11

2.2.1 Métabolisation par les flores digestives 11

2.2.2 Métabolisation tissulaire 12

2.3 Excrétion des fusariotoxines 13

2.3.1 Excrétion dans la bile, les urines et les fèces 13

2.3.2 Transfert dans les produits animaux 14

II. PROBLEMES LIES A LA PRESENCE DES FUSARIOTOXINES DANS LES ENSILAGES 16

Article de synthèse - *Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants ?* 16

III. LA DETOXIFICATION : INADAPTABILITE DES METHODES PHYSIQUES ET CHIMIQUES POUR LE TRAITEMENT DES ENSILAGES, DEVELOPPEMENT DE METHODES BIOLOGIQUES 30

1. Méthodes physiques et chimiques de détoxification 30

1.1 Méthodes physiques 30

1.2 Méthodes chimiques 33

2. Le développement de méthodes biologiques de détoxification 35

2.1 La biotransformation des fusariotoxines 35

2.1.1 Biotransformation par les végétaux 36

2.1.2 Biotransformation par des cultures pures de microorganismes..... 36

2.2 La séquestration par la paroi des microorganismes 38

2.2.1 Séquestration par la paroi des levures 38

2.2.2 Séquestration par la paroi des bactéries fermentaires 39

2.2.2.1 Structure de la paroi des bactéries fermentaires 39

2.2.2.2 La séquestration des mycotoxines par la paroi des bactéries fermentaires 42

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE 48

PARTIE EXPERIMENTALE 55

I. ELIMINATION DES FUSARIOTOXINES PAR LES BACTERIES FERMENTAIRES 56

1. Mise au point d'un test *in vitro* pour le criblage de souches bactériennes 56

1.1 Protocole expérimental 57

1.2 Article - Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro* 57

2. Criblage de souches 66

2.1 Choix des valeurs des paramètres du test in vitro 66

2.2 Choix des souches 66

2.3 Protocole expérimental 67

2.4 Article - Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro model simulating corn silage 67

3. Biotransformation de la zéaralénone en α zéaralénol : essais complémentaires .. 80

3.1 Cinétiques de biotransformation en infusât de maïs 80

3.1.1 Essai 1 80

3.1.2 Essai 2 81

3.2 Hypothèse sur la nature de l'enzyme catalysant la réduction de la zéaralénone en α zéaralénol 82

3.2.1 Essai 1 84

3.2.2 Essai 2 85

4. Potentiel de séquestration des fusariotoxines dans les ensilages par les bactéries fermentaires épiphytiques ou inoculées 86

II. DEVENIR DU COMPLEXE BACTERIE – FUSARIOTOXINE DANS LE TRACTUS DIGESTIF 88

1. Choix du modèle d'étude 89

2. Expérimentation 90

2.1 Protocole expérimental 90

2.2 Article - Stability of the zearalenone–Streptococcus thermophilus complex in ruminal fluid and in simulated gastrointestinal environment in vitro 90

III. MECANISME DE SEQUESTRATION DES FUMONISINES 98

1. Choix des fumonisines B_1 et B_2 comme fusariotoxines d'étude 98

2. Protocole experimental 99

3. Article - *Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisins B_1 and B_2 by lactic acid bacteria* **100**

DISCUSSION GENERALE 115

1. La séquestration des fusariotoxines: un phénomène largement répandu chez les bactéries fermentaires ? 116

2. Implication du peptidoglycane et influence de la structure des fusariotoxines sur le mécanisme de séquestration 119

3. Implications de la biotransformation de la zéaralénone en α zéaralénol par certaines bactéries lactiques 120

4. Conclusions et perspectives 121

REFERENCES 125

ANNEXES 148

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1. Efficacité *in vitro* et *in vivo* de différents agents adsorbants inorganiques, testés pour leur capacité à adsorber les fusariotoxines

Tableau 2. Réduction de la concentration de zéaralénone et de déoxynivalénol par différents agents adsorbants commerciaux dans un test *in vitro*

Tableau 3. Nature des acides aminés trouvés en position 3 du pentapeptide et dans le pont interpeptidique du peptidoglycane de quelques espèces de bactéries fermentaires et autres bactéries gram positives

Tableau 4. Réduction de la concentration de zéaralénone et de déoxynivalénol par différents produits commerciaux utilisant des microorganismes ou des enzymes de dégradation dans un test *in vitro*

Tableau 5. Composition de la microflore de différents compartiments du tractus gastrointestinal de porc

---

Encadré 1 : Choix des paramètres du test *in vitro* utilisé pour le criblage de souches de bactéries fermentaires

---

Figure 1. Structure des principales fusariotoxines présentes dans les aliments

Figure 2. Voies de biotransformation du déoxynivalénol, du diacétoxyscirpénol, de la toxine T-2 et de la zéaralénone par les microorganismes du rumen de bovins

Figure 3. Vue schématique de la paroi des bactéries gram positives

Figure 4. Représentation schématique en coupe radiale et tangentielle de la structure en réseau du peptidoglycane des bactéries lactiques. Exemple de structure détaillée d'un muropeptide de bactérie lactique

Figure 5 : Effet du stade de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* GG sur le taux de séquestration de la zéaralénone et des fumonisines B_1 et B_2

Figure 6. Cinétique de biotransformation de la zéaralénone en α zéaralénol par *Lactobacillus brevis* R0002 (essai 1)

Figure 7. Evolution de la DO_{600} relative et du pH lors de l'incubation pendant 24, 48 et 72 h à 25°C de l'infusât de maïs non préalablement acidifié contenant de la zéaralénone et ensemencé avec *Lactobacillus brevis* R0002 à 10^3 UFC/ml (essai 2)

Figure 8. Cinétique de biotransformation de la zéaralénone en α zéaralénol par *Lactobacillus brevis* R0002 (essai 2)

Figure 9. Substrats carbonylés stéroïdiens et non stéroïdiens de l'enzyme 3α-HSD/CR de *Comamonas testosteroni*.

Figure 10 : Réaction de réduction de la zéaralénone en α zéaralénol en milieu tampon phosphate 0,1 M, pH 7.

Figure 11 : Réaction de réduction de la zéaralénone en α zéaralénol en infusât de maïs acidifié à pH 4.

Figure 12. Nombre d'isolats sur milieu MRS obtenus à partir des contenus digestifs de bovins ayant consommés des rations riches en grain ou riches en fibres. Composition de la microflore du contenu et de la paroi de différents compartiments du tractus digestif de bovins ayant consommé des rations riches en fibres ou en grain.

LISTE DES ABREVIATIONS

AcDON: acétyl- déoxynivalenol

AFB_1 : aflatoxine B_1

AFM_1 : aflatoxine M_1

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AKR : aldo-keto reductases (aldo-céto réductases)

AP_1: aminopentol 1

AP_2: aminopentol 2

ATA : aleucie toxique alimentaire

CLHP (ou HPLC): chromatographie liquide haute performance

DAP: acide *méso*-diaminopimélique

DAS : diacétoxyscirpénol

DL50 : dose létale 50

DO: densité optique

DOM-1: déépoxydéoxynivalenol

DON : déoxynivalenol

ELISA : Enzyme-linked immuno-sorbent assay

EPS : exopolysaccharides

ESB : encéphalopathie spongiforme bovine

FA_{1-2} : fumonisine A_{1-2}

FAO : Food and Agriculture Organisation

FB_{1-4} : fumonisine B_{1-4}

FUS X: fusarénone X

CG : chromatographie en phase gazeuse

GRAS : generally recognised as safe

HSCAS : aluminosilicates de sodium et de calcium hydraté

HSD: hydroxystéroïde déshydrogénase

IARC : International Agency for Research on Cancer

LAB : lactic acid bacteria

LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

LC705 : *Lactobacillus rhamnosus* LC-705

LDB: *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*

LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG

LM : *Leuconostoc mesenteroides*

LTA: acides lipotéichoïques

MAS : monoacétoxyscirpénol

MRS: De Man, Rogosa and Sharpe

MS : spectrométrie de masse

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)

NAG: N-acétylglucosamine

NAM : acide N-acétylmuramique

NIV : nivalénol

OTA : ochratoxine A

PAB : propionic acid bacteria

PBPs: penicillin-binding proteins

PG: peptidoglycane

PJS: *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii JS*

SCEES : service central des enquêtes et études statistiques

SDR : short-chain dehydrogenases/reductases (déshydrogénases/réductases à courte chaîne)

TA : acides téichoïques

TCT : trichothécènes

TGI: tractus gastrointestinal

UDP : uridine diphosphate

UFC: unité formant colonie

ZAL: zéaralanol

ZAN: zéaralanone

ZEN : zéaralénone

ZOL: zéaralénol

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

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

- Niderkorn, V., Morgavi, D.P., Pujos, E., Tissandier, A., Boudra, H. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage. *Food Additives and Contaminants*, *in press* (acceptée le 27 octobre 2006)

- Niderkorn, V., Morgavi D.P., Boudra, H. Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants ? *Fourrages* (acceptée le 7 décembre 2006).

- Niderkorn, V., Morgavi D.P., Boudra, H. Stability of the zearalenone–*Streptococcus thermophilus* complex in ruminal fluid and in simulated gastrointestinal environment *in vitro*. *Travaux présentés lors du 14ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 17-19 mai 2006, Paris* (soumission prochaine)

- Niderkorn, V., Morgavi D.P., Aboab, B., Lemaire, M., Boudra, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisins B_1 and B_2 by lactic acid bacteria. (soumission prochaine)

Communications

Affichées (posters) :

- Congrès *Rencontres Recherches Ruminant* (Paris, 8 et 9 décembre 2004)
  Effet de l'addition d'agents biologiques sur la présence de mycotoxines *in vitro*

- *Journées d'Animation Scientifique* du département PHASE – INRA (Tours, 13 et 14 mars 2005)
  Capacité des bactéries lactiques à éliminer les fusariotoxines *in vitro*

- *Doctoriales* de l'Université Blaise Pascal (Confolant, juin 2005)
  Capacité des bactéries lactiques à éliminer les fusariotoxines *in vitro*

- Congrès *Gut microbiology* (Rowett Research Institute – INRA) (Aberdeen, 21-23 juin 2006)
  Binding and biotransformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone to α-zearalenol by lactic acid bacteria

Communications orales :

- *Conseils scientifiques* 2005 et 2006 de l'URH (INRA Clermont–Theix, 18 janvier 2005, 27 janvier 2006)

- *Lallemand Distributors Meeting*, 2 février 2005
  Mycotoxins in feeds – Effects on ruminants

- *Journées de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé* 2006 (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 30 mars 2006)
  Aptitude des bactéries fermentaires à séquestrer et biotransformer les fusariotoxines

- *Colloque du club des bactéries lactiques* (Paris, 17 au 19 mai 2006)
  Aptitude des bactéries fermentaires à séquestrer et biotransformer les fusariotoxines – Application à la détoxification des ensilages de maïs

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Mode opératoire *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires*

Annexe 2 : Mode opératoire *Conservation des souches de bactéries fermentaires*

Annexe 3 : Mode opératoire *Méthode turbidimétrique pour l'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires*

Annexe 4 : Mode opératoire *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B1 et B2 dans l'infusât de maïs acidifié*

Annexe 5 : Mode opératoire *Dosage de la zéaralénone, de l'α zéaralénol et du β zéaralénol dans les fractions solides et liquides du jus de rumen*

Annexe 6 : Mode opératoire *Dosage de la zéaralénone et de l'α zéaralénol dans le culot bactérien*

Annexe 7 : Protocole *Elimination des fusariotoxines par les bactéries fermentaires. Essais préliminaires pour la mise au point d'un test in vitro en vue d'un criblage de souches*

Annexe 8 : Protocole *Criblage de bactéries fermentaires pour leur capacité à séquestrer et/ou biotransformer les fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 en infusât de maïs acidifié*

Annexe 9 : Liste des souches criblées et fractions de fusariotoxines éliminées

Annexe 10 : Protocole *Essais de transformation de la zéaralénone en α zéaralénol par la 3α – hydroxystéroïde déshydrogénase en milieu tampon et en infusât de maïs acidifié*

Annexe 11 : Protocole *Etude de la stabilité du complexe Streptococcus thermophilus RAR1 – zéaralénone dans le jus de rumen et dans un environnement simulant le tractus gastrointestinal des ruminants in vitro*

Annexe 12 : Protocole *Mécanisme de séquestration des fusariotoxines par les bactéries fermentaires. Etude de l'interaction bactérie – fumonisines B_1 et B_2*

Annexe 13 : Recommandation de la commission des communautés européennes du 17 août 2006 concernant la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à la nutrition animale (2006/576/CE)

Annexe 14 : Poster Congrès *Rencontres Recherches Ruminant* (Paris, 8 et 9 décembre 2004). *Effet de l'addition d'agents biologiques sur la présence de mycotoxines in vitro*

Annexe 15 : Poster *Journées d'Animation Scientifique*, département PHASE – INRA (Tours, 13 et 14 mars 2005). *Capacité des bactéries lactiques à éliminer les fusariotoxines in vitro*

Annexe 16: Poster Congrès *Gut microbiology* (Rowett Research Institute – INRA) (Aberdeen, 21-23 juin 2006). *Binding and biotransformation of the Fusarium mycotoxin zearalenone to α-zearalenol by lactic acid bacteria*

INTRODUCTION

La production animale a été touchée par des crises sanitaires au cours des dernières années dont la dernière en date est celle de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) qui a entraîné un embargo commercial sur la viande bovine britannique de 1996 à 2002. Ces accidents ont entraîné des changements profonds dans l'attitude des citoyens face à la sécurité alimentaire. Un des enjeux actuels de l'ensemble des filières alimentaires est de produire des denrées saines et perçues comme telles par le consommateur.

Les problèmes sanitaires liés à la production végétale sont connus depuis longtemps: l'ergotisme, appelé encore le "feu de Saint-Antoine" est provoqué par l'ingestion d'aliments contaminés par les dérivés de l'ergot de seigle et l'Aleucie Toxique Alimentaire (ATA) survenue en Union Soviétique en 1930 suite à l'ingestion de fourrages contaminés par les trichothécènes. Mais c'est seulement en 1960 que la première mycotoxicose, appelée maladie X des dindons et rebaptisée aflatoxicose, a pu être mise en évidence scientifiquement en Grande-Bretagne où plus de 100 000 dindonneaux sont morts de nécroses du foie provoquées par des aflatoxines présentes dans des arachides importées du Brésil (Sargeant *et al.* 1961). Depuis, de nombreuses autres mycotoxicoses ont été décrites dont certaines en France (Le Bars et Le Bars 1996).

Différentes espèces végétales sont concernées mais ce sont surtout les céréales qui sont considérées comme des vecteurs potentiels de la contamination par les mycotoxines. La Food and Agriculture Organisation (FAO) a estimé que 25% des récoltes de céréales étaient touchées par les mycotoxines (Mannon et Johnson 1985). Une récente enquête réalisée par Pittet (1998) sur environ 10 000 échantillons de produits végétaux montre que plus de 40% des céréales sont contaminées par des aflatoxines, des fumonisines et des trichothécènes (TCT).

La contamination du végétal peut se faire à différentes étapes de la production, du stockage et de la transformation. Elle débute au champ et se poursuit au cours des processus de récolte, de séchage, de manutention et de stockage. On dénombre actuellement plusieurs milliers d'espèces de moisissures pouvant contaminer les aliments. Parmi la flore du champ, c'est incontestablement le genre *Fusarium* qui sévit le plus en provoquant des pertes importantes (fusariose), mais aussi en produisant, dans certaines conditions, des fusariotoxines (Mills 1989; Almeida *et al.* 2002) qui se retrouvent à la mise en silo des

fourrages et des grains. Ces fusariotoxines peuvent conduire à une diminution des performances zootechniques et à des problèmes de santé animale.

Un groupe important de fusariotoxines est constitué par les TCT dont le déoxynivalénol (DON ou vomitoxine), le nivalénol (NIV), le diacétoxyscirpénol (DAS) et les toxines T-2 et HT-2 sont les principaux représentants. Les autres fusariotoxines majeures sont la zéaralénone (ZEN) et le groupe des fumonisines. D'autres fusariotoxines comme la moniliformine et l'acide fusarique peuvent également être synthétisées au champ mais elles semblent moins importantes sur le plan de la fréquence et de leur impact sur les animaux.

Les recherches de mycotoxines dans les ensilages se sont surtout focalisées sur les mycotoxines de conservation comme les aflatoxines et l'ochratoxine A (OTA). Cependant, les données disponibles montrent que la présence de fusariotoxines est également fréquente à des niveaux variables selon les régions et les années de récolte (Engels et Kraemer 1996; Oldenburg *et al.* 1996; Lew *et al.* 1997; Whitlow *et al.* 1998; Kim *et al.* 2004).

Les ensilages de maïs, de légumineuses ou de graminées représentent aujourd'hui la part la plus importante de l'alimentation des ruminants en Europe et en Amérique du Nord et peut représenter jusqu'à 85% de leur ration (Deraedt 2003). La production d'ensilage permet aux éleveurs de disposer tout au long de l'année d'aliments à forte valeur énergétique et bien consommés par les animaux. La popularité de l'ensilage a ainsi fortement augmenté ces dernières décennies, notamment dans les régions de production intensive de lait et de viande bovine. En France, environ 1,4 millions d'hectares en culture de maïs fourrager, soit 16 millions de tonnes de matière sèche sont disponibles pour l'affourragement hivernal et estival des troupeaux (SCEES campagne 2005). On estime à 10 - 15% la part de la production totale d'herbe valorisée sous forme d'ensilage, soit 2,5 millions de tonnes de matière sèche (AFSSA 2004). Or, ces aliments, fabriqués *in situ* à la ferme, ne sont généralement pas contrôlés sur le plan de la contamination par les mycotoxines.

Le climat étant le facteur déterminant de la contamination des céréales au champ, du développement des *Fusarium spp.* et du type de fusariotoxines produites, les méthodes de prévention de la contamination des ensilages reposent principalement sur le respect d'un certain nombre de pratiques agronomiques au stade pré-récolte. Ces méthodes consistent à limiter l'inoculum fusarien (rotation des cultures, enfouissement des résidus de culture) et à

réduire le stress des végétaux (fertilité, irrigation). L'efficacité de ces pratiques n'est cependant que partielle et l'absence totale de fusariotoxines dans les fourrages ne peut être absolue, justifiant dans certains cas le recours à des méthodes de détoxification.

Depuis les années 1980, des produits capables de détoxifier les végétaux contaminés par les mycotoxines sont activement recherchés. Ces travaux se sont pour la plupart focalisés sur la détoxification des grains de céréales contaminés. Des méthodes physiques et chimiques ont ainsi été développées, notamment pour détoxifier les céréales contenant des aflatoxines. Cependant, ces méthodes ne sont pas suffisamment efficaces sur les fusariotoxines et souvent inadaptées au traitement des fourrages ensilés. En plus d'une méthode de détoxification efficace, les volumes de fourrages à traiter et leur faible valeur marchande font que les éleveurs doivent disposer d'une solution pratique et économique. A l'heure actuelle, cette méthode n'est pas disponible.

L'utilisation de microorganismes sélectionnés pour détoxifier les ensilages apparaît comme une alternative intéressante aux méthodes physiques et chimiques. Sur la base des données de la littérature, deux voies sont envisageables : la biotransformation des mycotoxines en résidus moins toxiques ou la diminution de leur absorption dans le tractus gastrointestinal (TGI) par séquestration au niveau de la paroi bactérienne (Styriak et Conkova 2002). Compte tenu de leur rôle dans la fermentation et leur utilisation comme additifs pour améliorer la conservation des ensilages, les bactéries fermentaires (bactéries lactiques et propioniques) constituent de bons microorganismes candidats.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'explorer la capacité des bactéries fermentaires à éliminer les fusariotoxines (par biotransformation et/ou séquestration) en vue de leur utilisation comme agent de détoxification des ensilages.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

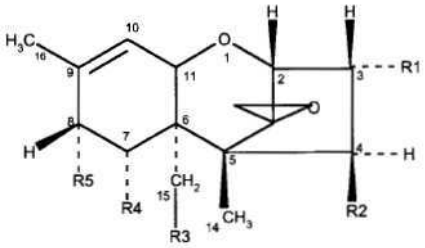
Ce chapitre a pour objectif de faire le point sur les connaissances actuelles relatives à la présence des fusariotoxines dans les ensilages et les méthodes de détoxification.

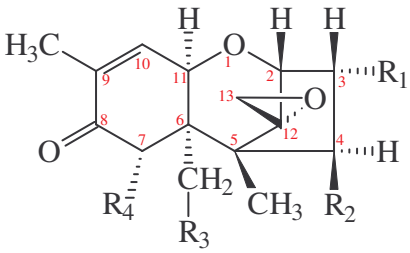
Dans la première partie, nous faisons un bref rappel concernant la structure, la toxicité et le devenir des fusariotoxines après leur ingestion par les animaux d'élevage consommant des ensilages.

La deuxième partie de cette synthèse a fait l'objet d'une publication dans la revue *Fourrages*.

Dans la dernière partie, nous rapporterons les différentes méthodes développées et utilisées pour la détoxification.

Trichothécènes

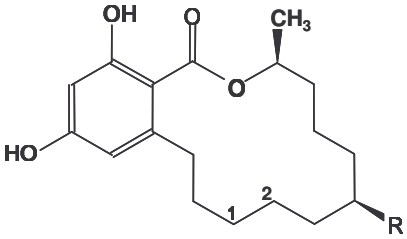




Type A	R1	R2	R3	R4	R5
Toxine T-2	OH	OAc	OAc	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
Toxine HT-2	OH	OH	OAc	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
Néosolaniol	OH	OAc	OAc	H	OH
DAS	OH	OAc	OAc	H	H

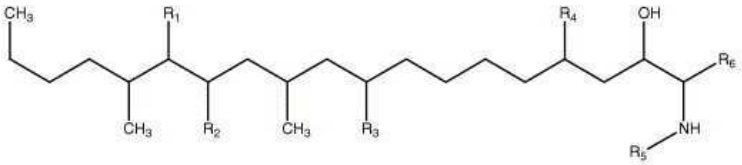
Type B	R1	R2	R3	R4
DON	OH	H	OH	OH
NIV	OH	OH	OH	OH
3-acDON	OAc	H	OH	OH
15-acDON	OH	H	OAc	OH
FUS-X	OH	OAc	OH	OH

Zéaralénone et dérivés

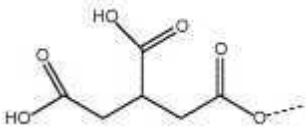


Toxine	R	C1-C2
Zéaralénone	O	CH=CH
α et β zéaralénol	OH	CH=CH
Zéaralanone	O	CH2-CH2

Fumonisines

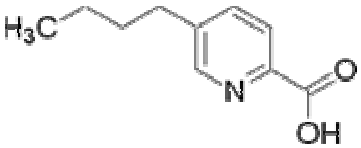


Acide tricarballylique (TCA)

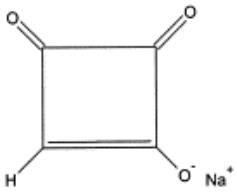


Toxine	R1	R2	R3	R4	R5	R6
FA_1	TCA	TCA	OH	OH	$COCH_3$	CH_3
FA_2	TCA	TCA	H	OH	$COCH_3$	CH_3
FA_3	TCA	TCA	OH	H	$COCH_3$	CH_3
FB_1	TCA	TCA	OH	OH	H	CH_3
FB_2	TCA	TCA	H	OH	H	CH_3
FB_3	TCA	TCA	OH	H	H	CH_3
FB_4	TCA	TCA	H	H	H	CH_3
AP_1	OH	OH	OH	OH	H	CH_3
AP_2	OH	OH	H	OH	H	CH_3

Autres fusariotoxines



Acide fusarique



Moniliformine

Figure 1. Structure des principales fusariotoxines présentes dans les aliments

I. LES FUSARIOTOXINES : STRUCTURE, TOXICITE, DEVENIR DANS L'ORGANISME

1. Relations structure - toxicité des principales fusariotoxines

Les fusariotoxines sont issues du métabolisme secondaire des *Fusaria* et présentent une grande variété de structures chimiques.

1.1 Les trichothécènes

Les TCT forment une large famille de sesquiterpènoïdes caractérisée par la présence d'un groupement époxyde en C_{12}-C_{13} et d'une double liaison entre le C_9 et le C_{10} (**figure 1**). Ils peuvent être classés en quatre groupes selon leur groupement fonctionnel caractéristique. Les TCT de type A incluent la toxine T-2, la toxine HT-2 et le DAS. Les TCT de type B se différencient des premiers par la présence d'une fonction cétone en C_8. Leurs principaux représentants sont le DON, les dérivés 3 et 15-acétyl-DON (3 et 15-acDON), le NIV et la fusarénone X (FUS X). Ces deux groupes sont retrouvés fréquemment comme contaminants naturels des aliments. Les TCT de type C sont caractérisés par la présence d'un époxyde supplémentaire en C_7-C_8 (ex: crotocine) et ceux de type D (verrucarines, roridines et satratoxines) possèdent un macrocycle entre le C_4 et le C_{15}.

La toxicité des TCT provient essentiellement du groupement époxyde en C_{12}-C_{13} qui est très réactif. L'élimination de ce groupement (déépoxydation) entraîne une baisse significative de leur toxicité (Thompson et Wannemacher 1986; Peng *et al.* 1996). Ainsi, le DON est biotransformé par certains microorganismes en dérivé déépoxydé, le déépoxydéoxynivalénol (DOM-1), dépourvu de toxicité.

In vivo, les TCT de type A s'avèrent généralement plus toxiques que ceux de type B chez les animaux d'élevage (D'Mello *et al.* 1999). *In vitro*, la toxine T-2 est également la plus toxique, suivie du NIV puis du DON (Ueno 1984). Plusieurs test de génotoxicité réalisés *in vitro* et *in vivo* sur des rongeurs sont positifs pour la toxine T-2 et la HT-2 toxine (Larsen *et al.* 2004). Le monoacétoxyscirpénol (MAS) et le scirpénol ont une toxicité proche de celle de la mycotoxine mère (DAS). La DL50 de la FUS X, administrée par voie orale à des souris, est 10 fois plus élevée que pour le NIV. Cette différence s'expliquerait par une absorption plus efficace de la FUS X, qui est ensuite rapidement convertie en NIV par le foie et les reins (Poapolathep *et al.* 2003).

Plusieurs modes d'action des TCT sont décrits :

La perturbation du métabolisme protéique. Les TCT se lient à la sous-unité 60 des ribosomes, inhibent l'activité de la peptidyl-transférase perturbant la synthèse protéique au niveau de l'initiation, de l'élongation et de la terminaison de la chaîne peptidique (Wei *et al.* 1974; Thompson et Wannemacher 1986; Rotter *et al.* 1996). La toxine T-2 semble inhiber davantage la synthèse protéique que le DON (Larsen *et al.* 2004).

La perturbation du système immunitaire. A faible dose, le système immunitaire est stimulé par les TCT via une augmentation du taux d'IgA plasmatiques et l'expression des gènes codant pour la cyclo-oxygénase-2, des cytokines ou des deschémokines (Azcona-Olivera *et al.* 1995). Dans les lymphocytes, la toxicité des TCT varie selon la nature du résidu en C_4 : acétyl > hydroxyl > hydrogène. Le système immunitaire est également la cible de la toxine T-2 et de ses métabolites (Oswald *et al.* 2005). La liaison du DON aux ribosomes induit la phosphorylation de protéines kinases conduisant à l'apoptose de macrophages et de lymphocytes T et B (Rocha *et al.* 2005).

L'hématotoxicité. L'absorption de TCT entraîne une diminution des thrombocytes, des leucocytes et des désordres dans la coagulation (Parent-Massin et Parchment 1998). Les effets hématotoxiques de la toxine T-2 sont les mieux décrits : son exposition répétée induit une leucopénie chez de nombreuses espèces animales. En revanche, la myélotoxicité des toxines T-2 et HT-2 s'avère beaucoup moins importante que celle du DON et du NIV (Larsen *et al.* 2004).

1.2 La zéaralénone et ses dérivés

La ZEN est une lactone macrocyclique (3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-méthyl-1H-2-benzoxacyclotétradécin-1,7-dione) dérivée de l'acide résorcyclique (**figure 1**). Les α et β zéaralénols (α et β ZOL) sont les principaux métabolites de la ZEN. Ces deux isomères sont obtenus par hydroxylation de la fonction cétone en C_4.

La ZEN et ses dérivés peuvent adopter une conformation proche du 17β-estradiol et des autres estrogènes naturels, si bien qu'ils peuvent se lier compétitivement aux récepteurs cytoplasmiques des oestrogènes et les activer. Le complexe récepteur-ZEN (ou dérivé) migre vers le noyau et initie la synthèse d'ARN spécifique et de protéines conduisant à des signes d'hyperoestrogénisme comme l'hypertrophie de certains organes sexuels (Tashiro 2000).

Les groupements phénol sont essentiels à l'activité puisque leur inactivation conduit à une forte réduction de celle-ci (Shier 1998). Cependant, le potentiel oestrogénique varie selon les métabolites. L'α ZOL montre une plus grande affinité pour les récepteurs oestrogéniques que la ZEN, ayant elle-même plus d'affinité que le β ZOL (Everett *et al.* 1987; Shier *et al.* 2001). Par conséquent, la réduction de la ZEN en α ZOL est considérée comme un mécanisme de bioactivation de la ZEN, tandis que la formation de β ZOL est considérée comme une désactivation.

1.3 Les fumonisines

Plusieurs fumonisines ont été isolées et identifiées à partir d'extraits de culture de *Fusarium spp*. et d'aliments contaminés**.** Elles sont composées de deux molécules d'acide tricarballylique (acide 1,2,3 propane tricarboxylique) estérifiées en positions 14 et 15 de la chaîne aliphatique, et peuvent être classées en trois groupes (A-C) (**figure 1**). Les groupes A (FA ; 2-acétylamino-12,16-diméthyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyeicosane) et B (FB ; 2-amino-12,16-diméthyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyeicosane) sont caractérisés par la présence d'une fonction amide et amine, respectivement. Les fumonisines du groupe C sont similaires aux FB à l'exception de l'absence du groupement "méthyl" en position 1. De toutes les fumonisines connues à cette date, ce sont les FB (FB_{1-4}) qui sont les plus fréquemment rencontrées. L'hydrolyse des parties acide propane tricarboxylique de la FB_1 et de la FB_2 conduit aux aminopentols, AP_1 et AP_2, respectivement.

La fraction amino-terminale semble être responsable de la toxicité des fumonisines. Des études de toxicité menées *in vitro* sur différents types de cultures cellulaires montrent que les FB sont cytotoxiques (à des niveaux variables) sur la quasi-totalité des systèmes cellulaires testés, alors que les FA (FA_1 et FA_2) ne semblent pas l'être (Abbas *et al.* 1993). Les aminopentols (AP_1 et AP_2) sont autant ou plus cytotoxiques que les molécules mères.

Les fumonisines sont des molécules dont la structure est proche de la sphingosine qui constitue le squelette hydrocarboné des sphingolipides. Ceux-ci interviennent dans les structures cellulaires, la croissance, la différentiation et la transformation néoplasique (Wang *et al.* 1991). Les fumonisines B_1 et B_2 agissent principalement par inhibition de la sphingosine N-acyltransferase (céramide synthétase), conduisant à l'accumulation de sphingoïdes libres (sphinganine et sphingosine) et à une déplétion en céramides chez plusieurs espèces animales (Wang *et al.* 1991; Riley *et al.* 1994; Shephard *et al.* 1996). Le rapport

sphinganine/sphingosine dans les urines est ainsi utilisé comme un marqueur d'exposition aux FB (Riley *et al.* 1993). Les conséquences de ce phénomène font intervenir les fonctions des sphingoïdes et des céramides, des seconds messagers impliqués dans de nombreux processus biologiques. Ainsi, une altération des structures membranaires et des signaux de transduction par voie de seconds messagers lipidiques peuvent être observés. Les effets cellulaires sont une altération de la prolifération des cellules, des communications intercellulaires, de l'adhésion cellulaire et de la modulation de l'expression génétique, ainsi que le déclenchement de l'apoptose (Merrill *et al.* 2001; Riley *et al.* 2001). Le foie et les reins sont les principaux organes cibles.

La toxicité des fumonisines se manifeste de façon variable selon l'espèce animale. Des oedèmes pulmonaires et des lésions hépatiques sont observés chez le porc (Colvin et Harrison 1992; Motelin *et al.* 1994), tandis que le syndrome caractéristique chez les chevaux est une leucoencéphalomalacie caractérisée par des liquéfactions localisées de la substance blanche de l'encéphale des équidés (Marasas *et al.* 1988). Elles sont également néphrotoxiques et/ou hépatotoxiques chez certaines autres espèces (lapin, poulet, singe, agneau) (Thibault *et al.* 1997) et favorisent le cancer du foie chez le rat (Riley *et al.* 1998). Chez l'homme, la présence de fumonisines dans du maïs a été corrélée avec une augmentation du risque de cancer de l'oesophage cancer dans certaines régions d'Afrique du Sud (Rheeder *et al.* 1992; Thiel *et al.* 1992), du nord de l'Italie (Franceschi *et al.* 1990), d'Iran (Shephard *et al.* 2000) et de Chine (Wang *et al.* 2000). En conséquence, les FB sont considérées comme des cancérigènes possibles pour l'homme (classe 2B) par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1993) (Vainio *et al.* 1993)

Les fusariotoxines dites « mineures » comme l'acide fusarique (**figure 1**) ou la moniliformine sont moins étudiées en raison d'une fréquence faible en tant que contaminant et/ou d'une toxicité modérée.

2. Devenir des fusariotoxines dans l'organisme chez les ruminants et le porc

Les ruminants sont considérés plus résistants à l'agression mycotoxique que les animaux monogastriques. Les effets des fusariotoxines sur les ruminants correspondent surtout à une altération de leurs performances zootechniques (réduction du gain de poids et de la production laitière), tandis que les espèces monogastriques, notamment le porc, sont davantage sujettes à

l'apparition de signes cliniques. En plus de leur différence de sensibilité aux fusariotoxines, les ruminants et le porc sont deux espèces animales dont l'ensilage (fourrages et grains, respectivement) peut constituer une part importante de leur ration (Haard *et al.* 1999; Castaing et Coudure 2000).

2.1 Absorption

La nature chimique des fusariotoxines conditionne leur taux de passage dans le système sanguin et leur distribution dans l'organisme.

Les TCT semblent rapidement absorbés. Le DON, le NIV et la toxine T-2 sont détectés dans le sang de porc moins de 30 minutes après leur ingestion (Eriksen et Pettersson 2004). Le pic d'absorption et les fractions de TCT absorbées varient selon les composés et les études entre 1 et 4,5 h et entre 10 et 50%, respectivement (Prelusky *et al.* 1988; Eriksen *et al.* 2003; Avantaggiato *et al.* 2004; Danicke *et al.* 2004a; Eriksen *et al.* 2004). Comparés aux TCT, la ZEN est mieux absorbée (Olsen *et al.* 1985; Avantaggiato *et al.* 2003). En revanche, les fumonisines apparaissent très peu absorbées. Chez les porcs, la quantité de FB_1 absorbée après administration intragastrique est estimée entre 3 et 6% (Prelusky *et al.* 1994), alors que chez la vache, aucune trace de FB_1 n'a été détectée dans le plasma après une administration orale de 1 ou 5 mg FB_1/Kg (Prelusky *et al.* 1995).

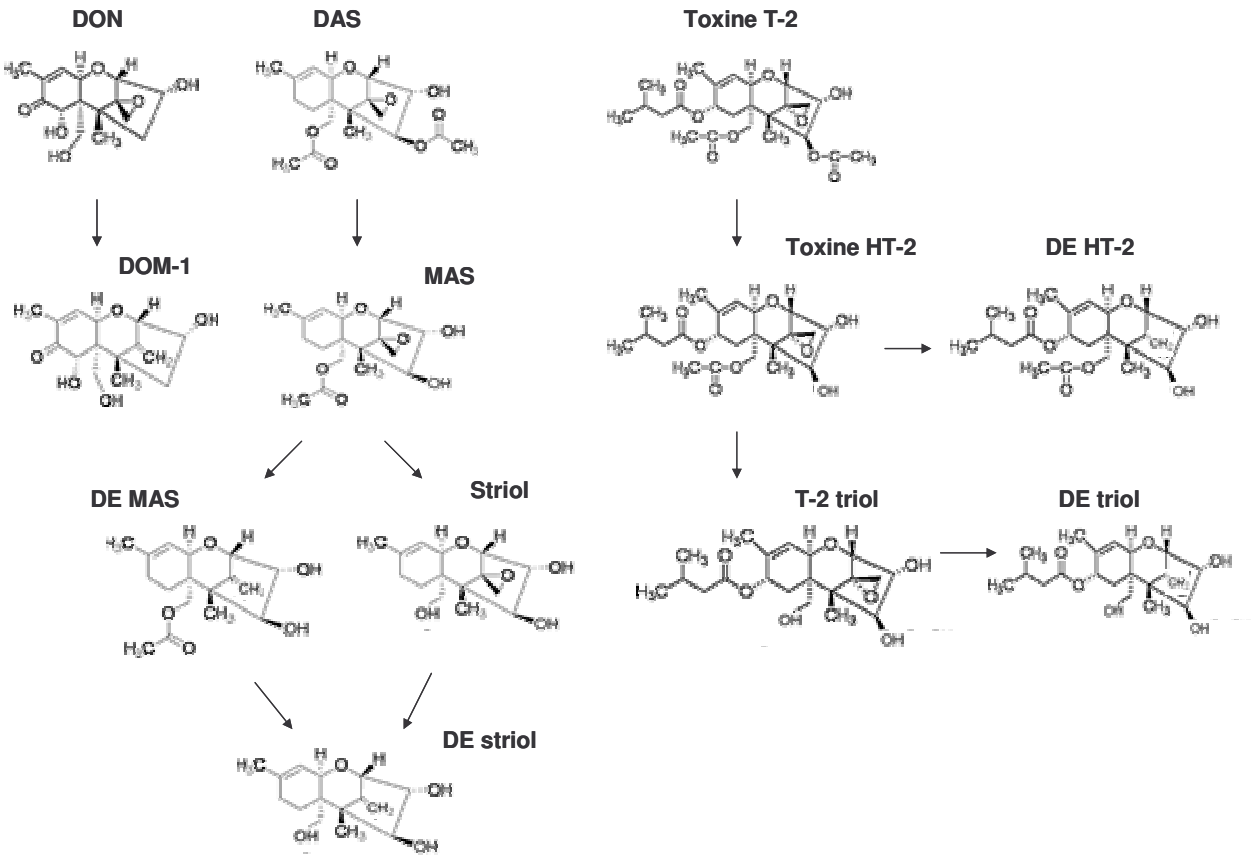
L'absorption rapide de la plupart des fusariotoxines semble indiquer que celle-ci a lieu dans les premiers compartiments du tractus digestif des animaux. Chez le porc, des études cinétiques montrent une absorption du DON, du NIV et de la ZEN au niveau de l'intestin grêle, principalement dans le jéjunum (Avantaggiato *et al.* 2003; Avantaggiato *et al.* 2004; Danicke *et al.* 2004a). Chez les ruminants, il n'est pas exclu qu'une partie des fusariotoxines soient absorbées au niveau du rumen. Cette possibilité est actuellement étudiée dans notre laboratoire.

2.2 Métabolisation

2.2.1 Métabolisation par les flores digestives

La microflore ruminale peut partiellement biotransformer les principaux TCT et la ZEN (**figure 2**). Le taux de transformation dépend du temps de séjour des aliments dans le rumen qui varie principalement selon la nature et la quantité des aliments ingérés. La toxine T-2 est convertie en HT-2 et T-2 triol (Kiessling *et al.* 1984; Westlake *et al.* 1987). Plusieurs TCT

(A)



(B)

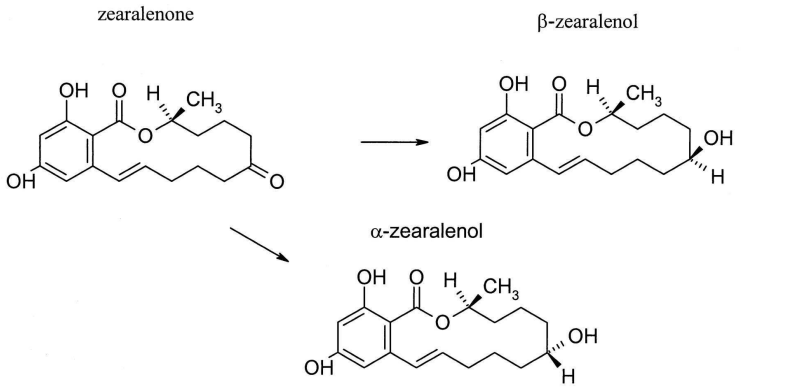


Figure 2. Voies de biotransformation (A) du déoxynivalénol (DON), du diacétoxyscirpénol (DAS), de la toxine T-2 et (B) de la zéaralénone (ZEN) par les microorganismes du rumen de bovins. DE = déépoxy (d'après Swanson et al. 1987).

sont déépoxydés et donc inactivés par les microorganismes de cet écosystème. Le DON est déépoxydé en DOM-1 (King *et al.* 1984) et le NIV en déépoxy NIV (Hedman et Pettersson 1997). Le DAS est déacétylé en MAS et en scirpènetriol, puis en déépoxy MAS et déépoxy-scirpènetriol (Swanson *et al.* 1987). Une fraction de la ZEN est réduite en α ZOL et dans une moindre mesure en β ZOL (Kallela et Vasenius 1982; Kiessling *et al.* 1984). En revanche, la FB_1 est peu métabolisée (12-18%) dans le rumen, ce qui suggère que la résistance des ruminants à cette fusariotoxine n'est pas due aux capacités de biodégradation de l'écosystème ruminal (Caloni *et al.* 2000).

Tout comme l'écosystème ruminal, la flore digestive des animaux monogastriques est capable de biotransformer certains TCT et la ZEN. Ces transformations sont réalisées par la flore du colon mais ne semblent pas être effectuées par celle de l'intestin grêle (Kollarczik *et al.* 1994). Chez le porc, le DON est déépoxydé en DOM-1. Des suspensions de microflores issues de fecès déépoxydent le NIV (Hedman et Pettersson 1997) et biotransforment le DAS en déépoxy MAS et déépoxyscirpènetriol (Swanson *et al.* 1988). La ZEN est transformée majoritairement en α ZOL (Kollarczik *et al.* 1994). Cependant, comme l'absorption des fusariotoxines s'effectue principalement au niveau de l'intestin grêle, la microflore digestive ne devrait pas participer de façon importante à la détoxification, notamment chez le porc (Eriksen *et al.* 2003; Danicke *et al.* 2004a).

2.2.2 Métabolisation tissulaire

Outre les biotransformations par les flores digestives, la métabolisation des fusariotoxines a surtout lieu dans le foie et a pour objectif de les rendre plus hydrosolubles et faciliter ainsi leur excrétion dans les urines.

Les TCT acétylés sont rapidement déacétylés. Après leur absorption, le 3-AcDON, la FUS X et la toxine T-2 sont rapidement convertis en DON, NIV et toxine HT-2 respectivement. Ensuite, la métabolisation des TCT diffère selon les espèces mais s'opère principalement par déépoxydation et glucuronidation (Eriksen *et al.* 2004). Entre 33 et 42% du DON trouvé dans le plasma de porc est conjugué (Eriksen *et al.* 2003). Des dérivés glucuronoconjugués sont également retrouvés dans la bile et l'urine de moutons (Prelusky *et al.* 1986).

La ZEN est déjà partiellement biotransformée au niveau des entérocytes. Des activités de réduction en α et β ZOL et de conjugaison de la ZEN ont été observées dans la muqueuse intestinale de truie *in vitro* (duodénum et le jéjunum) (Olsen *et al.* 1987). Les réactions de glucuronoconjuguaison semblent plus importantes que les réactions de réduction. Dans le foie, la ZEN est réduite en α et β ZOL, réactions catalysées par les 3α (β)-hydroxystéroïde déshydrogénases hépatiques (HSDs), puis la conjugaison des métabolites est catalysée par l'uridine diphosphate glucuronyl transférase (UDPGT) (Olsen *et al.* 1981). Plusieurs études indiquent des différences significatives entre espèces au niveau de la biotransformation hépatique de la ZEN chez les animaux d'élevage (Malekinejad *et al.* 2006b) qui semblent être à l'origine des importantes différences de sensibilité. Ainsi les volailles qui métabolisent majoritairement la ZEN en β ZOL sont moins sensibles à la ZEN que d'autres espèces comme le porc qui métabolisent plutôt la ZEN en α ZOL. Chez les ruminants, la ZEN et ses métabolites sont détectés dans la bile aux taux respectifs de 68% β ZOL, 24% α ZOL et 8% ZEN (Danicke *et al.* 2002). De plus, des différences d'affinité de l'α ZOL pour les récepteurs de différentes espèces animales ont été rapportées (Fitzpatrick *et al.* 1989).

Il ne semble pas y avoir d'étude montrant clairement une métabolisation systémique des fumonisines. Cependant, l'hydrolyse en monoesters ou en AP_1 par des hydrolases hépatiques et des enzymes intestinales a été évoquée (Galtier 1999).

2.3. Excrétion des fusariotoxines

Les fusariotoxines sont préférentiellement excrétées dans les urines et les fèces. L'excrétion fécale résulte d'une absorption limitée des fusariotoxines et de leurs métabolites dans le tractus gastrointestinal ou d'une élimination importante par le système biliaire.

2.3.1 Excrétion dans la bile, les urines et les fèces

Les TCT semblent rapidement éliminés : de très faibles concentration de DON et de ses dérivés sont encore présentes dans le plasma 8 h après ingestion et près de la totalité de la concentration plasmatique disparaît en 24 h chez le porc (Eriksen 2003; Danicke *et al.* 2004a). Chez les ruminants, l'excrétion du DON s'effectue principalement par voie urinaire, majoritairement sous formes conjuguée et déépoxydée (Cote *et al.* 1986a; Prelusky *et al.* 1986; Prelusky *et al.* 1987) tandis que la forme glucuronoconjuguée est largement prédominante dans l'urine de porc (Prelusky *et al.* 1988).

Le ratio des concentrations des formes libres ou conjuguées de ZEN, d'α ZOL et de β ZOL dans les urines est variable selon les espèces (Mirocha *et al.* 1981). Chez le porc, la ZEN est excrétée rapidement dans la bile sous forme de métabolites conjugués (Schneweis *et al.* 2005). Cette excrétion est à l'origine d'un cycle entérohépatique conduisant à la réabsorption de la ZEN et à une augmentation de la demi vie plasmatique. Chez la vache en lactation, 84% des métabolites urinaires de la ZEN sont sous formes glucurono- et sulfoconjuguées.

Les fumonisines absorbées sont majoritairement excrétées par le système biliaire. Ainsi, 70% d'une dose de 14C-FB_1 administrée à des porcs par voie intraveineuse sont retrouvés dans la bile. Comme, de plus, elles sont peu absorbées, elles sont majoritairement excrétées dans les fèces (Shier 2000).

2.3.2 Transfert dans les produits animaux

L'excrétion de certaines fusariotoxines et de leurs métabolites dans le lait peut s'effectuer par filtration intercellulaire, diffusion passive transmembranaire ou transport actif par l'intermédiaire de vésicules de sécrétion. Le taux de transfert semble généralement faible (inférieur à 1%) et ces composés ne sont détectés qu'après administration de fortes doses. De même, l'accumulation de résidus dans les tissus comestibles parait limitée.

L'ingestion d'une dose unique de 920 mg de DON par des vaches conduit à une concentration inférieure à 4 µg/l de DON sous forme libre ou conjuguée dans le lait (Prelusky *et al.* 1984). De plus, dans le lait de ruminants, les TCT sous forme déépoxydée semblent prédominants (Cote *et al.* 1986b; Prelusky *et al.* 1987). Le métabolisme ruminal semble déterminant dans le faible niveau de contamination du lait. Ainsi, les mêmes quantités de toxine T-2 sont détectées dans le lait de vache et de truie alors que le ruminant avait été exposé à une quantité 4 fois plus importante (Robison *et al.* 1979). Le taux de transfert de cette toxine reste cependant faible (0–2%) (Charmley *et al.* 1993). Le DON ne semble pas s'accumuler pas dans les tissus de porc après une exposition prolongée (Prelusky et Trenholm 1992).

L'excrétion de ZEN dans le lait sous forme libre et conjuguée se ferait à un taux dépendant de la dose ingérée et ne dépassant pas 0,06% (Shreeve *et al.* 1979; Prelusky *et al.* 1990). Bien que la ZEN et ses métabolites soient progressivement éliminés des tissus comestibles (Roybal *et al.* 1988), la ZEN a été détectée dans 20 à 25% d'échantillons de

viande fraîche à des concentrations atteignant 8.7 µg/kg (El-Hoshy 1999). En revanche, aucune trace de ces composés n'a été détectée dans les muscles, les reins, le foie et la parties grasses de bovins ayant ingéré 0.1 mg ZEN/jour/kg d'aliment (Danicke *et al.* 2002).

Bien que peu absorbée, la FB_1 peut persister assez longtemps dans les organes puisque de la radioactivité est encore mesurée dans le foie et les reins 72 h après son administration (Prelusky *et al.* 1994). Dans le cas d'une exposition chronique, cette persistance pourrait entraîner une accumulation des fumonisines dans certains organes. Chez les vaches, aucun résidu de FB_1 ni de son métabolite l'AP_1 n'a été retrouvé dans le lait d'animaux exposés à de la FB_1 par voie orale ou intraveineuse (Scott *et al.* 1994), pas plus que dans celui de truies (Becker *et al.* 1995). Une étude relate cependant la présence de FB_1 dans le lait de vache avec un taux de transfert négligeable (Hammer *et al.* 1996).

Bien que ces études tendent à suggérer un risque limité, l'effet d'un niveau intensif de production des animaux sur le transfert des fusariotoxines dans les produits est encore mal connu. Par ailleurs, peu de données sur ce transfert chez les petits ruminants et sur le transfert des fusariotoxines « mineures » sont disponibles. Ces questions doivent être étudiées avant de conclure à une absence totale de risque pour les consommateurs.

II. PROBLEMES LIES A LA PRESENCE DES FUSARIOTOXINES DANS LES ENSILAGES

Article de synthèse publié dans la revue *Fourrages*

Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D.P. Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants ?

Introduction

Présence et devenir des fusariotoxines dans les ensilages

Conséquences de la présence des fusariotoxines dans les ensilages

Comment prévenir la contamination des ensilages ?

Gestion de la contamination et stratégies de détoxification

Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants ?

V. Niderkorn[1,2], H. Boudra[1], D.P. Morgavi[1]

[1] I.N.R.A., Unité de Recherche sur les Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle
[2] Lallemand SAS, 19, rue des Briquetiers, BP 59, F-31702 Blagnac

Titre courant *:* Fusariotoxines dans les ensilages : production, prévention et détoxification
Mots-clés : Ensilages, *Fusarium*, fusariotoxines, mycotoxines, pertes économiques, santé animale, prévention, détoxification

RÉSUMÉ

La contamination des fourrages au champ par les moisissures du genre *Fusarium* et la possible production de fusariotoxines sont étroitement liées aux conditions climatiques. Bien qu'encore mal évaluée, leur présence dans les ensilages en concentrations variables est régulièrement observée. Des teneurs trop élevées de fusariotoxines peuvent entraîner une altération des performances zootechniques et des effets sur la santé des animaux. Actuellement, l'application de techniques agronomiques visant à limiter le niveau de contamination des végétaux par les *Fusaria* est la seule méthode efficace pour réduire l'exposition des animaux aux fusariotoxines. De nouvelles stratégies de prévention et de détoxification sont nécessaires pour compléter ces mesures.

SUMMARY

The infestation of forage crops in the field by moulds from the *Fusarium* genus and their possible production of fusariotoxins including deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins, is principally related to adverse climatic conditions and consequently not easily avoidable. Although few data are available, the presence of fusariotoxins in silages at different concentrations has been reported. A high amount of fusariotoxins in the ration can have toxic effects on animals affecting performances and health. Among farm animals, ruminants appear to be more resistant to fusariotoxins than monogastric animals. However, the effects of chronic exposure and the possible synergies between mycotoxins are not well known. To date, the use of agronomic practices to minimize the level of contamination of plants by *Fusarium* is the only efficient method to reduce the exposition of animals to fusariotoxins. However, this preventive approach is sometimes not enough to avert contamination implying that new detoxifying strategies to eliminate fusariotoxins are required. Physical and chemical methods of detoxification are not well adapted to the treatment of forages in term of selectivity, practice and cost. Some biological methods based on detoxifying properties of selected microorganisms and genetic engineering of plants (maize) are promising new ways against fusariotoxins.

La contamination des ensilages par les fusariotoxines intervient au champ, en dehors de tout problème de conservation. Les conséquences économiques et sanitaires d'une exposition des animaux d'élevage à ces mycotoxines justifient l'application rigoureuse des moyens de prévention disponibles et la recherche de nouvelles stratégies de détoxification.

Introduction

Les ensilages de maïs, de légumineuses et de graminées représentent aujourd'hui la part la plus importante de l'alimentation des ruminants en Europe et en Amérique du Nord. La production d'ensilage permet aux éleveurs de disposer tout au long de l'année d'aliments à forte valeur énergétique et bien consommés par les ruminants. La popularité de l'ensilage a ainsi fortement augmenté ces dernières décennies, notamment dans les régions de production intensive de lait et de viande bovine. En France, environ 1,4 millions d'hectares en culture de maïs fourrager, soit 16 millions de tonnes de matière sèche, sont disponibles pour l'affourragement hivernal et estival des troupeaux (campagne 2005, source SCEES). Près de 80% des vaches laitières en consomment pendant tout ou partie de l'année. On estime à 10 - 15% la part de la production totale d'herbe valorisée sous forme d'ensilage, soit 2,5 millions de tonnes de matière sèche. La qualité du stock fourrager conditionnant une année de performance, la valeur nutritionnelle et la qualité sanitaire des ensilages sont de toute première importance.

Parmi les facteurs affectant la qualité sanitaire des récoltes, **la contamination des végétaux au champ par les moisissures du genre *Fusarium* est particulièrement difficile à maîtriser**. Ces moisissures peuvent, dans certaines conditions, produire des fusariotoxines dont la présence dans les ensilages intervient **indépendamment de la qualité de la conservation**. Les recherches de mycotoxines dans les ensilages ont été focalisées jusqu'à maintenant sur les mycotoxines de conservation, principalement les aflatoxines ou l'ochratoxine A. Cependant, les données disponibles montrent que la présence de fusariotoxines est fréquente à des niveaux variables selon les régions et les années de récolte (WHITLOW *et al.*, 1998).

Les conséquences économiques liées aux pertes de productivité et aux effets sur la santé des troupeaux sont difficiles à évaluer, mais peuvent être potentiellement importantes si de fortes concentrations de fusariotoxines sont présentes dans la ration.

TABLEAU 1 : **Effets des fusariotoxines majeures sur les performances et la santé des ruminants**

TABLE 1: ***Effects of main fusariotoxins on ruminants' performances and health***

Fusariotoxine	Principales espèces productrices	Espèce animale	Effets sur les différentes espèces animales
Déoxynivalenol	*F. graminearum* (+) *F. culmorum* (+)	Bovins[1], moutons	Refus d'ingestion , immunodépression
Diacétoxyscirpénol	*F. graminearum* *F. culmorum*	Bovins[1]	Refus d'ingestion, lésions gastrointestinales, diarrhées
Toxines T-2 et HT-2	*F. sporotrichioides* *F. poae* (+)	Bovins	Effets similaires au déoxynivalénol Irritation / hémorragies du tractus gastro-intestinal
Zéaralénone	*F. graminearum* *F. culmorum*	Vaches laitières[1] Brebis	Hyperoestrogénisme, infertilité, avortements Infertilité, désordres reproductifs
Fumonisines	*F. moniliforme* *F. proliferatum*	Chevaux Agneaux Bovins	Leucoencéphalomacie Lésions hépatiques Peu d'effet

(+) Espèces responsables de fusarioses

[1] Réduction de la production de lait chez les vaches laitières

Puisqu'il est impossible d'agir sur les conditions climatiques qui conditionnent la contamination des végétaux, **il est essentiel pour les producteurs d'ensilage de connaître les moyens à leur disposition permettant d'en limiter l'ampleur**.

Cet article aborde les conditions de production des fusariotoxines au champ, les teneurs observées dans les ensilages, les effets d'une exposition importante sur la santé des animaux, ainsi que les moyens de prévention et de détoxification disponibles ou en développement.

Présence et devenir des fusariotoxines dans les ensilages

1. Principales espèces productrices et fusariotoxines associées

Les moisissures appartenant au genre *Fusarium* sont des champignons microscopiques (micromycètes) **phytopathogènes**. Leur dissémination est assurée par des spores, les microconidies ou macroconidies selon les espèces, présentes partout dans le sol, les débris végétaux et les graines. **Les fusariotoxines** sont des composés chimiquement et thermiquement stables issues du métabolisme secondaire des *Fusaria*. Elles sont produites essentiellement sur les céréales avec des dégâts perceptibles (fusariose) mais aussi en l'absence visible de *Fusarium*. Une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces de moisissures (tableau 1). Cependant, **si la fusariose provoque de fortes pertes de rendement, elle n'entraîne pas obligatoirement la présence massive de fusariotoxines** puisque certaines espèces comme *Microdochium nivale* sont incapable d'en produire et que les souches toxinogènes n'expriment pas toujours leur potentiel.

Parmi les nombreuses fusariotoxines identifiées, les **trichothécènes** constituent un groupe d'environ 200 composés dont les principaux sont le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV), le diacétoxyscirpénol (MISHRA et DAS) et les toxines T-2 et HT-2. **Le DON (ou vomitoxine)**, très fréquemment retrouvé dans les fourrages et les grains de céréales, est souvent considéré comme un **indicateur de contamination** : sa présence laisse supposer la présence d'autres fusariotoxines. La **zéaralénone** (ZEN) et le groupe des **fumonisines** constituent les autres fusariotoxines majeures. *Fusarium moniliforme* est le principal agent pathogène du maïs si bien que les fumonisines, produites par cette espèce, sont souvent retrouvées sur cette plante. D'autres fusariotoxines comme la moniliformine, les fusarines et l'acide fusarique peuvent également être synthétisées au champ mais elles semblent moins importantes sur le plan de la fréquence de contamination et de leur impact sur les animaux.

2. Conditions du développement des *Fusaria* et de la production de fusariotoxines

Comme les autres espèces fongiques, la croissance des *Fusaria* est principalement sous l'influence de la teneur en eau disponible dans le milieu, de la température, de l'environnement gazeux et de la présence d'autres microorganismes avec lesquels ils sont en compétition (BOUDRA *et al.*, 2002).

La contamination du maïs par les *Fusaria* est étroitement liée à la pluviométrie, notamment dans les sept jours précédant l'épiaison et dans les cinq à dix jours suivant l'émergence des épis. Les intempéries (vent, pluie, grêle), les rongeurs, les insectes et, plus généralement, tous les facteurs de stress et d'atteinte à l'intégrité des végétaux favorisent la pénétration et l'implantation des spores de *Fusarium*. **La production des fusariotoxines dépend principalement de la température.** L'alternance de conditions climatiques froides et douces est généralement associée à la production des trichothécènes et de ZEN. Plusieurs espèces peuvent produire des fusariotoxines à une température proche de zéro. Les années chaudes et sèches peuvent provoquer un stress hydrique et seraient plus favorables à la production de fumonisines que les années froides. La variabilité des conditions de production des fusariotoxines montre que, **dans une même zone géographique, chaque année peut fournir des profils de contamination différents**. L'amélioration des connaissances des facteurs écologiques et climatiques qui prédisposent à la contamination par *Fusarium* et à la production de fusariotoxines permet aujourd'hui de **mieux évaluer le risque dans une région et une année donnée**.

Les fusariotoxines sont également présentes **dans l'herbe**. En Nouvelle Zélande, la ZEN est fréquemment retrouvée en automne dans la flore des pâturages à des niveaux élevés et a été associée à des troubles de la reproduction chez les ruminants (TOWERS et SPROSEN, 1993).

3. Devenir des fusariotoxines lors du processus d'ensilage

La contamination des produits d'origine végétale destinés à l'alimentation animale peut intervenir au champ, durant leur conservation ou leur utilisation. Cependant, **dans les ensilages correctement réalisés et stabilisés, les *Fusaria* ne sont plus dans des conditions favorables à leur croissance**. Bien que la teneur en eau, la température et l'acidification du milieu ne soient pas des freins à leur développement, le niveau de confinement (anaérobiose) et la présence d'espèces concurrentes empêchent tout développement des *Fusaria*. Dans un ensilage réalisé dans de mauvaises conditions, **les *Fusaria* sont supplantés par d'autres espèces fongiques à développement luxuriant** comme les *Aspergilli* et les *Penicilli*. **Il n'en**

TABLEAU 2 : **Concentrations de fusariotoxines dans les ensilages de maïs et d'herbe.**

TABLE 2: **Fusariotoxin concentrations in corn and grass silages.**

Substrat ensilé	Fusariotoxine	Ech. positifs (%)[1]	Concentration (µg/Kg)		Référence
			Min - max	Moyenne[2]	
Maïs (récolte 1995)					OLDENBURG *et al* ., 1996
Epis	ZEN	8 (170)	9 - 170	50	
Reste plante	ZEN	98 (298)	5 - 2970	390	
	DON	92 (60)	120 - 3510	1130	
Maïs (récolte 1996)					
Epis	ZEN	16 (100)	7 - 100	30	
Reste plante	ZEN	76 (299)	6 - 820	60	
	DON	100 (58)	730 - 12390	4070	
Maïs					LEW *et al* ., 1997
Feuilles	DON	83 (6)	260 - 2550	930	
Tiges	DON	100 (6)	3250 - 13750	8690	
Maïs	ZEN	30 (487)		525	WHITLOW *et al* ., 1998
	DON	66 (778)		1990	
	Toxine T-2	7 (717)		569	
	Fumonisines	37 (63)			
Maïs	FB1	97 (89)		615	KIM *et al* 2004
	FB2	72 (89)		93	
	FB3	57 (89)		51	
Ryegrass	ZEN	67 (832)	40 - 2780[3]		ENGELS et KRÄMER, 1996

DON (déoxinivalénol), ZEN (zéaralénone), FB1/FB2/FB3 (fumonisines B1/B2/B3)

[1] Le nombre total d'échantillons analysés est entre parenthèses

[2] Moyenne des échantillons positifs

[3] Valeurs sur matière sèche

reste pas moins que les fusariotoxines préformées sont présentes à la mise en silo. Un exemple a été rapporté dans lequel la présence de fusariotoxines dans un ensilage sans contamination fongique visible, avec une bonne couleur et une bonne odeur a été identifiée comme la cause de troubles chez un troupeau de vaches laitières (RANKIN *et al.*, 2002).

Les études sur l'effet du processus d'ensilage sur le contenu en fusariotoxines montrent généralement que celles-ci ne sont **pas ou peu dégradées**. Ainsi, la teneur en ZEN d'un ensilage de maïs naturellement contaminé à 13 ppm était stable durant 12 semaines de conservation (LEPOM *et al.*, 1988). Une stabilité comparable de la ZEN a été observée en absence ou en présence de conservateur (OLDENBURG, 1991). Les données semblent plus contradictoires pour le DON (LEPOM *et al.*, 1990; MANSFIELD *et al.*, 2005). D'une manière générale, le nombre d'études sur la stabilité et les conditions d'une éventuelle dégradation des fusariotoxines lors de la conservation est encore insuffisant. Des travaux sont engagés sur cet aspect au sein de notre laboratoire. Les enquêtes disponibles sur la contamination des ensilages semblent néanmoins montrer que **les fusariotoxines sont régulièrement présentes dans les ensilages de maïs et d'herbe à des niveaux pouvant être élevés** (tableau 2). Là encore, les données sont encore fragmentaires, notamment en ce qui concerne les ensilages de légumineuses et de graminées pour lesquelles les études sont quasiment inexistantes.

Conséquences de la présence de fusariotoxines dans les ensilages

1. Conséquences économiques

La fusariose, maladie qui affecte essentiellement les céréales (blé, maïs), peut provoquer des pertes pouvant atteindre 50% de la récolte. Mais, **même en absence de dégâts apparents**, les fusariotoxines peuvent être présentes dans les fourrages ensilés et entraîner des pertes économiques dues à une **diminution des performances zootechniques** (diminution de la production laitière et/ou du gain de poids, infertilité, cycles de sélection manqués) et à **divers coûts supplémentaires** (analyse des aliments, frais vétérinaires, utilisation d'additifs). Ces pertes sont difficiles à évaluer car les conséquences de la présence de fusariotoxines dans l'alimentation animale ne sont pas toujours clairement identifiées et pourraient donc être sous-estimées.

2. Effets des fusariotoxines sur les performances et la santé des ruminants

Les conséquences d'une contamination par les fusariotoxines peuvent être également sanitaires puisque ces mycotoxines sont dangereuses pour l'animal. **Les ruminants**

apparaissent cependant plus résistants aux effets des fusariotoxines que les animaux monogastriques, notamment le porc. Cette moindre sensibilité est attribuée à la capacité de l'écosystème microbien du rumen à métaboliser partiellement bon nombre de ces mycotoxines (DON, DAS, toxines T-2 et HT-2, ZEN). Cependant, le taux de conversion dépend du type de fusariotoxine et du temps de séjour des aliments dans le rumen.

Bien que le problème soit moins prégnant que pour d'autres espèces animales, des effets sur la productivité et, plus rarement, sur la santé des ruminants peuvent être observés (tableau 1). Au-delà des effets spectaculaires des mycotoxicoses, **les conséquences de l'ingestion prolongée de faibles doses de fusariotoxines et les effets synergiques avec d'autres mycotoxines ou agents pathogènes doivent être considérés**. Or, bien que leur existence soit établie, ces conséquences sont encore mal connues. Le diagnostic n'est pas toujours facile car **les symptômes peuvent être de nature secondaire comme des infections opportunistes dues au caractère immunodépressif de la majorité des fusariotoxines**. De plus, les effets de ces mycotoxines sont modulés par des différences de sensibilité selon l'espèce, l'âge, le sexe, le type de ration, le niveau de production imposé et l'état de santé des animaux.

La fixation de concentrations sécuritaires est donc assez aléatoire. Cependant, des recommandations de la commission européenne relatives à la présence des fusariotoxines majeures dans les produits destinés à l'alimentation animale sont désormais disponibles (recommandation 2006/576/CE du 17 août 2006). Les teneurs maximales recommandées tiennent compte essentiellement du type d'aliment et de la sensibilité des différentes espèces animales.

3. Transfert dans les produits animaux

Les fusariotoxines subissent successivement des biotransformations par les microorganismes ruminaux, puis par différents systèmes enzymatiques du tube digestif et du système sanguin qui modifient leur toxicité et leurs voies d'excrétion. Le passage de résidus dans les produits animaux est un aspect crucial en terme de sécurité alimentaire. Le transfert de DON, ZEN, toxine T-2 et fumonisines dans le lait est **faible ou nul** (BOUDRA *et al.*, 2002). La ZEN et ses métabolites ne sont pas détectées dans les tissus comestibles comme le muscle, le foie ou les reins de bovins exposés (DANICKE *et al.*, 2002). **La présence de ces fusariotoxines dans la ration à des niveaux de contamination naturels ne semble donc pas constituer un risque majeur pour les consommateurs**. Cependant, concernant les autres fusariotoxines, le transfert dans les produits animaux est encore inconnu.

ENCADRE 1 : **Pratiques agronomiques permettant de réduire la contamination des végétaux par les fusariotoxines**

BOX 1: ***Agronomic practices allowing to reduce the contamination of plants by fusariotoxins***

Méthodes dont l'efficacité est avérée

Réduction de l'inoculum

- La rotation des cultures : le précédent maïs augmente considérablement le niveau de contamination
- Le labour favorise l'enfouissement des résidus de culture et leur décomposition rapide

Réduction du stress des végétaux

- Une fertilité équilibrée du sol (rapport N/K)
- L'irrigation, sauf au stade critique de contamination

Récolte précoce (avant la fin de maturation)

Méthodes potentiellement efficaces ou en développement

- L'utilisation d'agents antifongiques en début de floraison
- L'utilisation de variétés résistantes aux infections fongiques
- L'utilisation de souches antagonistes afin d'inhiber la croissance des *Fusaria* toxinogènes

Comment prévenir la contamination des ensilages ?

Les fusariotoxines étant produites au champ, les stratégies de prévention sont ciblées au niveau des stades sensibles de pré-récolte et récolte.

1. Pré-récolte

Bien que les conditions climatiques qui conditionnent en grande partie le développement des *Fusaria* et la production de leurs toxines ne soient pas maîtrisables, un certain nombre de pratiques agronomiques peut en limiter l'ampleur (box 1). D'une manière générale, ces pratiques ont montré leur efficacité à deux niveaux : d'une part, **en limitant l'importance de l'inoculum fusarien** en effectuant des rotations de cultures et en enfouissant les résidus après la récolte, et d'autre part, **en réduisant les stress des végétaux**. L'utilisation d'agents antifongiques au moment de la floraison peut également être envisagé. Cependant, il ne peut pas être exclu que ces produits modifient l'équilibre entre les différentes espèces de moisissures dans le sens des plus toxinogènes. De plus, en ce qui concerne le traitement des fourrages au champ, le coût économique et écologique semble assez important et l'utilisation de ces agents doit être maîtrisée.

Face au succès partiel de ces mesures de prévention, d'autres stratégies font actuellement l'objet de développements. Les recherches concernent principalement **la mise au point de variétés de maïs résistantes** par sélection conventionnelle ou génie génétique. Les caractères pouvant permettre une diminution de la présence de mycotoxines sont liés à la présence de **barrières mécaniques ou chimiques à l'infection fongique** (dureté et composition des grains, composition et viabilité des soies, production de composés inhibiteurs comme les phytoalexines) ou **d'enzymes capables d'interférer avec la production de mycotoxines, voire de les cataboliser**. Ainsi, une diminution significative du niveau d'infection par *Fusarium* et de l'accumulation de fumonisines dans le maïs Bt (*Bacillus thuringiensis*) résistant à certains insectes a été observée (HELLMICH et MUNKVOLD, 2001). Cependant, peu de variétés présentant un niveau de résistance satisfaisant sont à ce jour disponibles, même sur le marché des pays dont la réglementation permet la culture des plantes transgéniques. La possibilité d'utiliser **des souches de moisissures non toxinogènes pouvant entrer en compétition avec les souches productrices de toxines** est également à l'étude. Cependant la possibilité de recombinaison avec des souches toxinogènes est toujours possible.

2. Récolte

Si la contamination des végétaux par les *Fusaria* s'effectue au moment de la floraison, **la production de fusariotoxines n'est effective qu'en fin de maturation** (MS = 35-40%). Par conséquent, il est préférable de ne pas laisser les végétaux au champ plus longtemps qu'il n'est nécessaire. Il convient donc d'utiliser des hybrides dont la maturation est adaptée à la zone climatique. Le maïs semé tardivement au printemps, récolté tard à l'automne ou ayant subi une gelée, a tendance à contenir plus de fusariotoxines. Il est généralement recommandé de récolter **à partir du stade vitreux (MS = 30-35%) pour le maïs plante entière**. La récolte à une MS de **25-30% pour les graminées** (juste avant épiaison) **et les légumineuses** (début boutons floraux), apparaît comme le meilleur compromis valeur alimentaire / ingestion / qualité de conservation. **En présence d'un champ infecté, les zones les plus contaminées ne devraient pas être récoltées** afin de limiter le risque d'une concentration importante de fusariotoxines à l'ensilage.

Il est important de noter que si le respect scrupuleux des bonnes pratiques d'ensilage et l'utilisation de conservateurs comme certains acides organiques ou inoculants qui stimulent la fermentation peuvent inhiber la croissance des moisissures de conservation et limiter la production de leurs mycotoxines, **ces techniques ne sont d'aucune utilité contre les fusariotoxines présentes à la mise en silo**.

Gestion de la contamination et stratégies de détoxification

L'alimentation destinée aux ruminants (fourrages et concentrés) est principalement produite *in situ* par les éleveurs et le contrôle sanitaire de ces aliments n'est généralement effectué qu'en cas d'intoxication.

1. Evaluer le niveau de contamination

En cas de suspicion de mycotoxicose (effets sur les performances ou la santé des animaux), **les autres causes possibles des symptômes observés doivent être envisagées et éliminées** car certains de ces symptômes peuvent être similaires à d'autres maladies infectieuses et métaboliques. L'avis d'un vétérinaire et/ou l'analyse de l'ensilage suspect pour son contenu en mycotoxines les plus fréquentes (DON, ZEN, toxine T-2 et fumonisines) sont nécessaires pour établir le diagnostic.

Des kits commerciaux d'analyse rapide pour les mycotoxines majeures basés sur la méthode ELISA ou l'immunochromatographie commencent à être disponibles sur le marché. Ces tests ne sont en général que qualitatifs et leur coût varie de 10 à 50 euros par échantillon.

En cas de résultats positifs, seules la confirmation et la quantification en laboratoire par des méthodes de référence permettra de disposer d'un niveau précis de contamination. **La forte hétérogénéité de la contamination rend difficile le prélèvement d'échantillons représentatifs**. Les *Fusaria* peuvent produire une quantité de mycotoxines importante sur une petite surface, si bien que la concentration peut fortement varier dans un même lot d'ensilage. Il est nécessaire d'effectuer 15 à 20 prélèvements à divers endroits du silo et de les mélanger pour former un échantillon homogène unique. La contamination des autres aliments composant la ration doit être également envisagée. Puisqu'il existe des centaines de mycotoxines, même la réponse du laboratoire d'analyse ne concernera que quelques toxines et ne donnera donc qu'une indication de la contamination de l'échantillon. Toutefois, **la teneur en DON est un bon indicateur de la contamination par les fusariotoxines**.

Lors d'une année particulièrement propice aux contaminations fongiques, il peut être intéressant de tester la teneur en fusariotoxines à la mise en silo pour pouvoir disposer du résultat avant l'utilisation de l'ensilage. Dans le cas d'une suspicion sur la qualité sanitaire de l'ensilage, il peut également être utile de le tester sur quelques animaux avant de le distribuer à tout le troupeau. A noter que les frais engagés pour évaluer et traiter la présence de fortes teneurs de fusariotoxines dans la ration sont à rapporter aux diverses pertes potentielles évoquées précédemment.

2. Que faire face à une contamination importante ?

Si des concentrations inacceptables sont constatées, **il est recommandé de ne pas utiliser l'ensilage contaminé et de le remplacer par une ration saine** lorsque cela est possible. Les animaux en bas âge, en période de gestation et de lactation sont particulièrement sensibles à l'effet des mycotoxines et ne devraient donc pas être alimentés avec des aliments fortement contaminés.

L'introduction d'aliment sain pour diluer la ration contaminée et amener la concentration à un niveau inférieur aux recommandations n'est pas autorisée par la législation européenne (Directive 2002/32/EC du 7 mai 2002).

Face à un déficit d'aliment, le recours à des méthodes de détoxification peut être envisagé. La bentonite, un adsorbant à base d'argile par ailleurs connu pour réduire les pertes liquides dans des ensilages faibles en matière sèche, peut fixer certaines mycotoxines dans le tractus digestif et les entraîner dans les excréments, réduisant leur absorption et minimisant ainsi leurs effets. Ils sont relativement bon marché et la dose d'utilisation recommandée est de 0,5-1 g/Kg de MS de la ration. Cependant, ces adsorbants ont surtout montré leur efficacité

sur les aflatoxines et **leur capacité à fixer les fusariotoxines semble limitée**. Les études montrent qu'aucun adsorbant unique n'est encore efficace contre la majorité des mycotoxines majeures et que les résultats obtenus *in vitro* ne se confirment pas toujours *in vivo* (HUWIG *et al.*, 2001). De plus, ces adsorbants peuvent aussi fixer des nutriments essentiels comme les vitamines, entraînant une diminution de la valeur nutritionnelle des aliments.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode pratique, économique et spécifique pour détoxifier les fourrages contenant de fortes concentrations de mycotoxines. Les méthodes physiques et chimiques décrites pour la détoxification des grains de céréales et des tourteaux comme l'ammoniation ne sont pas adaptées au traitement des fourrages.

La mise au point d'agents détoxifiants est aujourd'hui un challenge important. Les recherches portent principalement sur des formulations d'adsorbants inorganiques mais aussi sur des **méthodes biologiques**. Concernant ces dernières, les deux voies explorées sont **la biodégradation** (bioconversion en composés moins toxiques par des enzymes ou des cellules entières) **et la fixation des mycotoxines au niveau de la paroi microbienne** avec le même effet recherché que pour les adsorbants inorganiques.

Les glucomannanes extraits de la **paroi de la levure** *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier efficacement *in vitro* les fumonisines, la ZEN et dans une moindre mesure les trichothécènes (DEVEGOWDA, 2000; YIANNIKOURIS *et al.*, 2004). Un glycane de levure modifié peut également adsorber la toxine T-2 efficacement (FREIMUND *et al.*, 2003). Compte tenu du rôle des **bactéries fermentaires** (bactéries lactiques et propioniques) dans la conservation des fourrages ensilés et de leur capacité à croître facilement en conditions d'ensilage, **ces microorganismes apparaissent comme de bons candidats pour la détoxification des fusariotoxines**. Ainsi, des souches probiotiques de *Lactobacillus* et *Propionibacterium* sont capables de séquestrer *in vitro* la ZEN et son principal dérivé l'α-zéaralénol mais aussi les trichothécènes avec toutefois des différences entre les mycotoxines (EL-NEZAMI *et al.*, 2002a; EL-NEZAMI *et al.*, 2002b). Des études réalisées dans notre laboratoire montrent que cette capacité à séquestrer les fusariotoxines majeures *in vitro* est largement répandue chez les bactéries fermentaires et que les fumonisines peuvent également être séquestrées (NIDERKORN *et al.*, 2006).

Parmi les travaux les plus marquants sur la biodégradation des fusariotoxines, une souche bactérienne anaérobie stricte (*Eubacterium* BBSH 797), capable d'inactiver par de-époxydation la plupart des trichothécènes, a été isolée à partir d'une culture mixte enrichie à partir de contenu ruminal bovin (FUCHS *et al.*, 2002). De même, une lactonohydrolase qui catalyse la conversion de la ZEN en un composé moins oestrogénique a été identifiée chez le

champignon *Clonostachys rosea* (TAKAHASHI-ANDO *et al.*, 2002). La métabolisation partielle de la ZEN par des microorganismes, dans lesquels le gène *zhd101* codant la lactonohydrolase a été cloné, a été récemment obtenue.

Si l'agent détoxifiant idéal n'existe pas, le développement de mélanges de produits actifs alliant capacité d'adsorption et biodégradation des mycotoxines est en cours. Certains produits issus de ces recherches commencent à apparaître sur le marché mais **leur efficacité *in vivo* n'est pas toujours conforme aux attentes** (DANICKE *et al.*, 2002). La poursuite de ces investigations devrait cependant pouvoir, à terme, apporter des solutions à des situations particulièrement difficiles.

Conclusion

La maîtrise du risque lié à la présence des fusariotoxines dans les ensilages reste étroitement lié à la prévention du développement fongique au champ et immédiatement après la récolte. Cependant, les préjudices économiques potentiels et la demande croissante des consommateurs en matière de sécurité alimentaire justifient les recherches sur de nouvelles méthodes de prévention et de détoxification des mycotoxines. L'amélioration des connaissances sur les facteurs environnementaux qui déclenchent la contamination par les *Fusaria* et la production de fusariotoxines devraient permettre de mieux évaluer le niveau de risque dans une zone géographique et une année donnée. Parallèlement, les méthodes biologiques faisant appel aux propriétés détoxifiantes de certains microorganismes et au génie biotechnologique pourraient être sources de nouvelles stratégies de lutte contre les fusariotoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUDRA H., MORGAVI D.P., GALTIER P., MICHALET-DOREAU B. (2002): "Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in conserved forage: significance and prevention", *Renc. Rech. Ruminants, Paris, 4-5 décembre 2002.*

DANICKE S., GADEKEN D., UEBERSCHAR K.H., MEYER U., SCHOLZ H. (2002): "Effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone", *Arch. Anim. Nutr.*, 56, 245-261.

DEVEGOWDA G. (2000): "Mettre les mycotoxines sur la touche : d'où viennent les glucomannanes estérifiés", *Feeding Times*, 4, 12-14.

EL-NEZAMI H.S., CHREVATIDIS A., AURIOLA S., SALMINEN S., MYKKANEN H. (2002a): "Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*", *Food Addit. Contam.*, 19, 680-686.

EL-NEZAMI H.S., POLYCHRONAKI N., SALMINEN S., MYKKANEN H. (2002b): "Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol", *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3545-3549.

ENGELS R., KRAEMER J. (1996): "Incidence of *Fusaria* and occurrence of selected *Fusarium* mycotoxins on *Lolium* spp. in Germany", *Mycological Res.*, 12, 31-40.

FREIMUND S., SAUTER M., RYS P. (2003): "Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan", *J. Environ. Sci. Health Part B*, 38, 243-255.

FUCHS E., BINDER E.M., HEIDLER D., KRSKA R. (2002): "Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797", *Food Addit. Contam.*, 19, 379-386.

HELLMICH R.L., MUNKVOLD G.P. (2001): "Reduced mycotoxins in transgenic (Bt) maize", *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, 222, 67.

HUWIG A., FREIMUND S., KAPPELI O., DUTLER H. (2001): "Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents", *Toxicol. Lett.*, 122, 179-188.

KIM E.K., MARAGOS C.M., KENDRA D.F. (2004): "Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn silage", *J. Agric. Food Chem.*, 52, 196-200.

LEPOM P., BAATH H., KNABE O. (1988): "Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize. 3. The influence of silaging on the zearalenone content of CCM maize", *Arch. Tierernach.*, 38, 817-823.

LEPOM P., KNABE O., BAATH H. (1990): "Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize. 7. Formation of deoxynivalenol (DON) in a maize plot artificially inoculated with *Fusarium culmorum* and the influence of ensilaging on the stability of DON formed", *Arch. Tierernach.*, 40, 1005-1012.

LEW H., ADLER A., BRODACZ W., EDINGER W. (1997): "Zum Vorkommen von Nivalenol in Getreide und Mais", *Mycotoxin Res.*, 19, 6-9.

MANSFIELD M.A., DE WOLF E.D., KULDAU G.A. (2005): "Relationships between weather conditions, agronomic practices, and fermentation characteristics with deoxynivalenol content in fresh and ensiled maize", *Plant Dis.*, 89, 1151-1157.

MISHRA H.N., DAS C. (2003): "A review on biological control and metabolism of aflatoxin", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 245-264.

NIDERKORN V., BOUDRA H., MORGAVI D.P. (2006): "Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*", *J. Appl. Microbiol.*, 101, 849-856.

OLDENBURG E. (1991): "Mycotoxins in conserved forage. Conference on forage conservation towards 2000, Braunschweig 23-25 Jan 1991." *Landbauforschung Voelkenrode. Sonderheft*, 191-206.

OLDENBURG E. (1997): "Fusarientoxine in Silomais. Abhängigkeit von Sorte und Standort", *Jahresbericht FAL*, 29.

OLDENBURG E., LEPSCHY J., VALENTA H., WEISSBACH F. (1996): "Fusarientoxine in Silomais. Abhängigkeit von Sorte und Standort", *Mycotoxin Res.*, 12, 174-179.

RANKIN M., GRAU C., PETER L.J. (2002): "Part II: Agronomic considerations for molds and mycotoxins in corn silage and high moisture corn", *Focus on Forage*, 4, 1-4.

TAKAHASHI-ANDO N., KIMURA M., KAKEYA H., OSADA H., YAMAGUCHI I. (2002): "A novel lactonohydrolase responsible for the detoxification of zearalenone: enzyme purification and gene cloning", *Biochem. J.*, 365, 1-6.

TOWERS N.R., SPROSEN J.M. (1993): "Zearalenone-induced infertility in sheep and cattle in New Zealand", *NZ Vet. J.*, 41, 223-224.

WHITLOW L.W., HAGLER W.M., HOPKINS B.A. (1998): "Mycotoxin occurrence in farmer submitted samples of North Carolina feedstuffs: 1989-1997", *J. Dairy Sci.*, 81 (Abstr.), 1189.

YIANNIKOURIS A., FRANCOIS J., POUGHON L., DUSSAP C.G., BERTIN G., JEMINET G., JOUANY J.P. (2004): "Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall", *J. Food Prot.*, 67, 1195-1200.

III. LA DETOXIFICATION : INADAPTABILITE DES METHODES PHYSIQUES ET CHIMIQUES POUR LE TRAITEMENT DES ENSILAGES, DEVELOPPEMENT DE METHODES BIOLOGIQUES

Pour être efficaces, les procédés de détoxification des mycotoxines doivent i) entraîner leur destruction ou leur inactivation, ii) ne pas produire de résidus toxiques et/ou cancérigènes ou mutagènes dans l'aliment ou dans les produits animaux, iii) ne pas altérer significativement les principales propriétés technologiques et nutritionnelles du produit, iv) être économiquement applicables (Bata et Lasztity 1999). Ce denier critère est particulièrement crucial pour la détoxification des fourrages dont la valeur marchande est faible et les volumes à traiter importants.

1. Méthodes physiques et chimiques de détoxification

Le développement de méthodes de détoxification des végétaux contaminés par les mycotoxines a surtout porté sur le traitement des graines de céréales et de leurs dérivés contenant des aflatoxines. Les céréales constituant un aliment de base en nutrition humaine, l'influence des procédés de fabrication des aliments comme la cuisson, la panification ou la fermentation brassicole sur la stabilité des mycotoxines a été largement étudiée (Boudra *et al.* 1995; Scott 1998; Saunders *et al.* 2001).

De nombreuses méthodes physiques et chimiques ont été testées pour la détoxification des grains destinés à la nutrition humaine ou animale. Bien que la majorité de ces méthodes soient restées au stade des essais de laboratoire en raison de leur inapplicabilité, certains procédés sont utilisés industriellement pour des applications spécifiques. Les études sur la détoxification des ensilages sont en revanche peu nombreuses et ne concernent que certains adsorbants inorganiques. Le principe de ces méthodes et leur efficacité vis-à-vis des fusariotoxines sont synthétisés ci-dessous.

1.1 Méthodes physiques

Dans certains cas, les grains moisis et contaminés par des mycotoxines possèdent des propriétés physiques (taille, poids, couleur, fluorescence) différentes des grains non atteints et peuvent être séparés sur la base de ces propriétés. Certaines de ces techniques sont utilisées industriellement pour réduire le niveau de contamination d'arachides, de pistaches ou de figues séchées contenant des aflatoxines (Scott 1998; Pearson *et al.* 2001). Par exemple, il est

Tableau 1. Efficacité *in vitro* et *in vivo* de différents agents adsorbants inorganiques, testés pour leur capacité à adsorber les fusariotoxines

Adsorbant	**Concentration d'adsorbant**	**Fusariotoxine et concentration dans l'aliment**	**Adsorption *in vitro***	**Adsorption *in vivo***	**Référence**
ARGILES					
HSCAS	0,5-1 %	DON (3,75 - 7,5 mg/Kg)		Inefficace chez le porc	Patterson et Young (1993)
	0,5%	DAS		Réduction de l'effet toxique = 3% (poulet)	Kubena et al. 1993
	0,5%	Toxine T-2 (8 mg/Kg)		Inefficace chez le poulet	Kubena et al. 1990
	0,5%	ZEN		Ne réduit pas les effets oestrogéniques chez le vison	Bursian et al 1992
Bentonites	1 g	ZEN	Capacité d'adsorption = 0,11 mg		Ramos et al. 1996
	2 - 5%	ZEN/NIV (3.0 mg/kg / 11.5 mg/kg)		Inefficace pour réduire les réponses toxiques chez le porc	Williams et al 1994
	1 mg/ml	FB1 (3.25 et 13 µg/ml)	99% et 12% FB1 , respectivement		Solfrizzo et al. 2001
Sepiolite	2 mg/ml	DON (4 µg/ml)	4.53%		Galvano et al. 1998
	1g	ZEN	Capacité d'adsorption = 0.07 mg		Ramos et al. 1996
Celite	1 mg/ml	FB1 (3.25 et 13 µg/ml)	Inefficace		Solfrizzo et al. 2001
montmorillonite	0,5%	ZEN (35 mg/Kg)		Ne protège pas les souris des effets oestrogéniques	Lemke et al. 2001
CHARBON ACTIF					
	2 mg/ml	DON (4 µg/ml)	Jusqu'à 98.93%		Galvano et al. 1998
	0,5%	toxine T-2 (6 mg/Kg)		Peu efficace chez le poulet	Edrington et al. 1997
	1 g	OTA + trichothecenes	Capacité d'adsorption =124 mg OTA + 9.9 mg trichothecenes		Galvano et al. 1998
	1 mg/ml	FB1 (26 et 200 µg/ml)	100% et 62% FB1, respectivement		Solfrizzo et al. 2001
	1%	FB1 (30 mg/Kg)		Inefficace pour réduire la toxicité chez le porc	Piva et al. 2005
RESINES					
Cholestyramine	1 g	ZEN	Capacité d'adsorption = 1.76 à 2.0 mg		Ramos et al. 1996
	3%	ZEN (6 mg/Kg)		Réduit la perte de poids corporel et de l'utérus chez la souris	Underhill et al. 1995
	1 mg/ml	FB1 (200 µg/ml)	85%		Solfrizzo et al. 2001
	2%	6 ou 20 mg FB1 + FB2/kg		Efficace pour réduire l'absorption des FB dans le GIT de rats (6 ou 20 mg/kg FB1 + FB2).	Solfrizzo et al. 2001
Polymères de divinylbenzène-styrène	5%	toxine T-2 (3 mg/Kg pendant 2 semaines)		Diminue la toxicité	Guerre 2000
	5%	ZEN (100 mg/Kg)		Diminue l'excretion urinaire et les résidus dans le foie (rat)	Guerre 2000
Polyvinylpyrrolidone	0,20%	DON (5 - 14 mg/Kg pendant 5 semaines)		Inefficace chez le porc	Guerre 2000

possible de trier des figues selon la présence ou non de fluorescence consécutive à une contamination par *Aspergillus flavus* (Boudra *et al.* 1994). La séparation par flottaison permet de fractionner efficacement des grains contaminés par le DON, la ZEN ou les fumonisines sur la base de leur densité (Huff et Hagler 1985; Hagler 1991; Vasanthi et Bhat 1998). Cependant, ces méthodes conduisent à des écarts d'efficacité très importants et ne permettent d'éliminer que des lots fortement contaminés.

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

Le **tableau 1** synthétise les travaux portant sur l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de différents adsorbants inorganiques testés pour leur capacité à adsorber les fusariotoxines. D'une manière générale, leur efficacité, si elle est importante pour les aflatoxines, est limitée pour les fusariotoxines. Ces agents montrent une capacité d'adsorption variable *in vitro* et n'empêche pas l'apparition des effets toxiques lorsqu'ils sont testés *in vivo*. De plus, il semble que, compte tenu de leur fort pouvoir adsorbant et de leur taux d'inclusion élevé, certains de ces agents puissent diminuer la biodisponibilité de certains micronutriments présents dans la ration, comme les vitamines.

Les premiers travaux sur les argiles se sont focalisés sur les aflatoxines. Dès 1979, une étude rapporte que des argiles minérales sont capables d'adsorber l'AFB_1 dans la bière et le lait *in vitro* (Masimango *et al.* 1979). Ces agents sont devenus populaires lorsque, dans les années 1980, il a été montré que les aluminosilicates de sodium et de calcium hydraté (HSCAS) avaient une haute affinité pour l'AFB_1 (Phillips *et al*. 1988) et étaient efficaces pour la prévention des aflatoxicoses chez une grande variété d'animaux (Huwig *et al*. 2001). En revanche, les HSCAS ne réduisent pas les effets oestrogéniques de la ZEN (Bursian *et al*. 1992) et leur efficacité est totalement nulle contre les trichothécènes (Kubena *et al*. 1990; 1993; Patterson et Young 1993).

Les bentonites constituent l'agent de détoxification des mycotoxines le plus utilisé en alimentation animale. Ce sont des argiles montmorillonite formées par le vieillissement des cendres volcaniques. Elles sont composées d'une microstructure cristalline lamellaire dont la

composition et l'adsorption varient du fait de l'interchangeabilité des cations positionnés sur les différentes couches. La capacité à adsorber les mycotoxines n'est pas leur application primaire. Elles sont généralement utilisées en alimentation animale comme agent thérapeutique contre les diarrhées et les inflammations (Petkova *et al.* 1981; Dembinski *et al.* 1985), comme agent liant pour donner de la consistance à des aliments liquides, ou comme dispensateur de minéraux. Elles agissent également comme absorbant d'eau pour réduire les pertes sous forme de jus dans les ensilages à faible matière sèche (Woolford *et al.* 1983). La bentonite est plutôt bon marché mais des effets néfastes sont rapportés si elle est administrée à une trop forte concentration dans la ration. Le taux d'incorporation de bentonite généralement recommandé dans les ensilages (10 kg/tonne) tend à augmenter la teneur en minéraux et à réduire sa digestibilité (Cook *et al.* 1980). La bentonite de sodium protège efficacement les animaux contre l'AFB_1 mais, concernant les fusariotoxines, des essais montrent que l'effet protecteur de la bentonite contre la toxine T-2 chez le rat (Carson et Smith 1983), du nivalénol et de la zéaralénone chez le porc (Williams *et al.* 1994) n'est plus observé aux concentrations d'argile utilisables dans l'alimentation animale.

D'autres argiles comme les sépiolite ou les célites sont peu efficaces pour adsorber les fusariotoxines même *in vitro* (Ramos *et al.* 1996; Galvano *et al.* 1998; Solfrizzo *et al.* 2001). La montmorillonite, capable d'adsorber la ZEN, ne protège pas les souris de ses effets oestrogéniques (Lemke *et al.* 2001a).

La capacité du charbon actif à adsorber les fusariotoxines *in vitro* est assez importante (Galvano *et al.* 1998; Solfrizzo *et al.* 2001) mais les essais *in vivo* montrent une efficacité limitée (Edrington *et al.* 1997; Piva *et al.* 2005). De plus, le caractère très colorant et la présentation du produit rendent son utilisation délicate même en alimentation animale.

La cholestyramine, une résine d'ammonium quaternaire échangeuse d'anions utilisée pour des applications pharmaceutiques, est efficace pour adsorber des mycotoxines anioniques comme la ZEN et les fumonisines dans des expérimentations *in vivo* (Underhill *et al.* 1995; Solfrizzo *et al.* 2001). D'autres résines comme les polymères de divinylbenzène-styrène réduisent également les effets toxiques de certaines fusariotoxines (Smith 1982). Cependant, bien qu'efficaces, ces agents sont trop coûteux pour être utilisés avantageusement dans les fermes.

D'autres méthodes physiques testées en laboratoire comme l'irradiation aux rayons X, UV ou micro-ondes, l'extraction par des solvants ou certains traitements thermiques peuvent dégrader certaines fusariotoxines à des degrés divers (Scott 1998) mais sont tout à fait inapplicables en nutrition animale.

1.2 Méthodes chimiques

Une large variété de composés chimiques peut dégrader ou inactiver, à des degrés divers, certaines mycotoxines.

De simples procédures de lavage des grains avec de l'eau ou une solution de carbonate de sodium permettent une réduction importante de la concentration en DON et ZEN dans les grains d'orge et de maïs (Trenholm *et al*. 1992; Pei *et al*. 2005). Cependant, la quantité d'énergie requise pour sécher les grains ne rend cette solution économiquement rentable que s'ils sont destinés à une utilisation en milieu humide (Rotter *et al.* 1995; Scott 1998).

L'ozone est un puissant oxydant dont la cible privilégiée sont les double liaisons. C'est un gaz assez stable mais, dans un environnement aqueux, sa durée de demi-vie est d'environ 20 minutes. L'ozone se décompose alors en oxygène. Ce procédé peut être utilisé pour dégrader certains trichothécènes dont le DON (Young *et al.* 1986; 2006), la ZEN (Lemke *et al*. 1999), la FB_1 (McKenzie *et al*. 1997) et la moniliformine (Zhang et Li 1994). Le traitement du DON et de la ZEN à l'ozone peut conduire à leur dégradation rapide sans production de co-produits détectables, tandis que la FB_1 est dégradée en différents produits présentant encore une toxicité (McKenzie *et al.* 1997; Young *et al.* 2006). Des procédés optimisés (Oxygreen®) sont utilisés dans la filière « grains-farine » avec une destruction minimale de nutriments importants.

Le traitement à l'ammoniac (ammoniation) est utilisé à l'échelle industrielle depuis plusieurs décennies pour la détoxification des tourteaux d'arachides contaminés par les aflatoxines provenant d'Afrique et d'Amérique latine (Viroben *et al.* 1978). D'autres végétaux comme le maïs, les graines de coton ou les arachides peuvent être traités par ce procédé (Gardner *et al.* 1971; Park *et al.* 1988; Scott 1998; Hoogenboom *et al.* 2001). L'ammoniation semble également efficace contre la ZEN (Goldblatt et Dollear 1979) et l'OTA (Chelkowski *et al.* 1982). En revanche, en dépit d'une réduction de la teneur en FB_1

dans du maïs contaminé et traité, aucune réduction de la toxicité n'a été observée chez des rats (Norred *et al.* 1991; Chourasia 2001).

Le bisulfite de sodium est capable de réagir avec les trichothécènes pour former des dérivés sulfonates hydrosolubles. Une réduction de 95% de la teneur en DON de maïs qui en contenait initialement 540 mg/kg a été obtenue par autoclavage à 121°C pendant 1h en présence de 8.3% de sodium bisulfite en solution aqueuse. Le DON-sulfonate étant non toxique pour les porcs, ce traitement a été proposé pour détoxifier le maïs contaminé par du DON destiné à ces animaux (Young *et al*. 1987; Danicke *et al*. 2005).

Le chauffage de la FB_1 dans des solutions tamponnées contenant des sucres réducteurs comme le D-glucose ou le fructose permet de bloquer le groupement amine responsable de la toxicité par l'intermédiaire du brunissement non enzymatique (réaction de Maillard) (Lu *et al*. 2002). Les produits obtenus ne semblent pas induire les effets toxiques de la FB_1 chez le porc (Fernandez-Surumay *et al*. 2004).

D'autres traitements chimiques ont montré des effets sur certaines fusariotoxines. Un mélange aqueux d'hydroxyde de calcium et de monoéthylamine est efficace pour détoxifier des aliments contenant de la toxine T-2 et du DAS (Trenholm *et al*. 1989). La FB_1 est significativement désaminée en solution aqueuse à pH acide et à basse température par addition de nitrite de sodium (Lemke *et al.* 2001b). Le traitement thermique dans un mélange de bicarbonate de sodium et de peroxyde d'hydrogène avec ou sans hydroxyde de calcium peut éliminer totalement la FB_1 de grains de maïs. Cette méthode s'inspire du procédé de nixtamalisation, une technique de cuisson alcaline du maïs réalisée en Amérique centrale depuis l'époque précolombienne (Palencia *et al.* 2003). La chlorine et l'eau oxygénée sont efficaces pour la détoxification de maïs contaminé par la moniliformine (Zhang et Li 1997).

A l'heure actuelle, aucune stratégie ne semble adaptée à la détoxification des ensilages contaminés par les fusariotoxines. Les méthodes physiques et chimiques décrites précédemment sont utilisées presque exclusivement pour la détoxification des aliments destinés à la nutrition humaine. Pour le traitement des ensilages, elles sont impraticables car mal adaptées à la nature physique des fourrages (méthodes physiques), trop onéreuses (résines), trop drastiques (méthodes chimiques), trop ou pas assez spécifiques, ou encore insuffisamment efficaces (adsorbants inorganiques).

Tableau 2. Réduction de la concentration de zéaralénone (ZEN) et de déoxynivalénol (DON) par différents agents adsorbants commerciaux dans un test *in vitro* (Döll et al. 2004)

Produit	Composition	ZEN éliminée (%)	DON éliminé (%)
Charbon actif [1]	Adsorbant	100 ± 0	67 ± 6
Cholestyramine [2]	Résine échangeuse d'anions	94 ± 1	10 ± 15
Bentonite [3]	Argile	81 ± 6	17 ± 16
Aluminosilicate modifié [4]	Mélange de bentonite et de montmorillonite	55 ± 1	1 ± 2
Toxisorb® [5]	Mélange de bentonite et de montmorillonite	24 ± 1	24 ± 18
Fix-A-Tox® [6]	Aluminosilicate	5 ± 1	21 ± 31

[1] Merck KgaA, Darmstadt, Allemagne; [2 3] Sigma, St-Louis, MO, Etats-Unis; 4 5 Süd-Chemie AG, Moosburg, Allemagne;
[6] Alvetra et Werfft AG, Wien, Autriche

Des différences d'efficacité in vitro et in vivo et entre les types d'animaux étant fréquemment observées, l'emploi d'une méthode unique, même populaire comme la bentonite, reste aléatoire. Une étude récente utilisant un modèle in vitro simulant le TGI des porcs (pH, température, temps de transit) montre que les adsorbants disponibles sur le marché sont peu ou pas efficaces sur le DON et la ZEN au taux d'inclusion recommandé par les fabricants (**tableau 2**) *(Doll et al. 2004). Dans cette étude, le charbon actif, la cholestyramine et un aluminosilicate modifié étaient les plus efficaces, notamment sur la ZEN, tandis que la bentonite n'était efficace qu'à forte concentration dans la ration. De nouvelles méthodes de détoxification, adaptées au traitement des fourrages et des ensilages, restent donc à développer.*

2. Le développement de méthodes biologiques de détoxification

Les deux voies de détoxification envisageables avec des microorganismes sont la biotransformation des mycotoxines par des enzymes ou des cellules entières et leur séquestration au niveau de la paroi microbienne (Styriak et Conkova 2002).

2.1 La biotransformation des fusariotoxines

La résistance de certaines variétés végétales aux effets phytotoxiques des fusariotoxines, la moindre susceptibilité des ruminants aux fusariotoxines (attribuée à l'écosystème ruminal) et la capacité de biotransformation par les microorganismes du sol ou du contenu digestif des mammifères sont autant de phénomènes montrant l'existence de systèmes biologiques capables de dégrader les fusariotoxines. Ces milieux biologiques complexes sont les principales sources au sein desquelles les activités de biodégradation ont été recherchées.

L'utilisation directe comme additif alimentaire de microorganismes détoxifiants peut être envisagée. Cependant, le caractère anaérobie de la plupart des microorganismes isolés d'environnements comme le jus de rumen peut être un frein à leur utilisation car leur croissance et leur activité ne sont pas garanties en dehors de leur biotope. Une autre possibilité est de caractériser les gènes codant les enzymes responsables de la biotransformation et de les exprimer dans une variété végétale ou un microorganisme candidat comme additif. Une stratégie pour l'isolement de microorganismes détoxifiants consiste à sélectionner des souches à partir de contenu ruminal, digestif ou de sol en les faisant croître sur un milieu de culture dans lequel la mycotoxine est la seule source de carbone. Cependant,

peu de microorganismes sont capables de croître sur un milieu avec une seule source carbonée. Une stratégie similaire consiste à cribler des souches microbiennes en ajoutant les mycotoxines dans un milieu de culture et en observant simultanément leur disparition et la production d'un ou plusieurs dérivés. Enfin, une autre possibilité est de constituer des banques de gènes candidats avec des cultures mixes actives. L'ADN total est extrait et les enzymes sont identifiées.

En plus de la métabolisation des fusariotoxines par les microflores digestives ruminales et intestinales décrites précédemment (chapitre I-2), des biotransformations ont été observées chez certaines espèces végétales et chez certains microorganismes.

2.1.1 Biotransformation par les végétaux

Les transformations de la toxine T-2 en 3'-hydroxy T-2, toxine HT-2, 3'-hydroxy HT-2 et T-2 tétraol, et du DAS en MAS par des hybrides de *Baccharis* ont été rapportées (Mirocha *et al.* 1988). Des études évoquent la transformation du DON par certaines variétés de blés résistantes à cette fusariotoxine (Miller *et al.* 1985; Yao *et al.* 1996) et de plusieurs autres trichothécènes dans des racines de pommes de terre (Fujita et Yoshizawa 1989, 1990). Cependant, dans ces cas, les produits de dégradation n'ont pas été clairement identifiés. La conjugaison du DON avec le glucose en 3-β-D-glucopyranosyl-4-déoxynivalénol par une culture de tissu de maïs (Sewald *et al.* 1992) a été mise en évidence, et une UDP-glucosyltransférase catalysant le transfert de glucose à partir d'UDP-glucose vers le groupe 3-OH du DON et du 15-acDON a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* (Poppenberger *et al.* 2003). Cependant, la conjugaison des fusariotoxines dans les végétaux ne peut pas toujours être considérée comme une détoxification car l'hydrolyse du produit conjugué dans le TGI de certains mammifères lors de la digestion peut conduire à la libération de la molécule mère (Gareis *et al.* 1987). C'est le cas du complexe zéaralénone-glucopyranoside dont la formation a été observée dans des tissus de maïs (Engelhardt *et al.* 1988). Ce complexe peut être clivé dans le TGI de porc, puis la ZEN libérée peut y être réduite en α ZOL (Gareis *et al.* 1990). Par ailleurs, de nombreux végétaux peuvent transformer l'acide fusarique en produits moins toxiques (Karlovsky 1999).

2.1.2 Biotransformation par des cultures pures de microorganismes

Plusieurs travaux ont rapporté que l'activité de biotransformation d'un mélange de souches n'est plus mise en évidence après isolement des microorganismes et essais avec des

cultures pures. Ces pertes d'activité ont été observées avec le ZEN (Megharaj *et al.* 1997) et le DON (He *et al.* 1992). Ceci peut être du au caractère non cultivable de la souche active, mais aussi à des interactions entre différentes espèces pouvant être indispensables, comme l'activation du substrat par un microorganisme et la dégradation par un autre, ou encore l'induction de l'enzyme détoxifiante par le métabolite d'une autre souche.

Des microrganismes actifs ont cependant été isolés. Plusieurs souches de moisissures et de bactéries sont capables de biotransformer la toxine T-2 en toxine HT-2, T-2 triol et en néosolaniol (Westlake *et al.* 1987; El Sharkawy 1991). La bactérie *Butyrivibrio fibrisolvens*, isolée à partir de jus de rumen de mouton, est capable de transformer le DAS en son dérivé déacétylé, le 15-acétoxyscirpénol (Matsushima *et al.* 1996), mais qui est aussi toxique que la molécule mère (Richardson et Hamilton 1990). Une bactérie isolée du sol et apparentée à *Agrobacterium-Rhizobium* (souche E3-39) est capable de convertir *in vitro* le DON en 3-céto-4-déoxynivalenol dont les propriétés immunodépressives seraient réduites de 90% par rapport à la molécule mère (Shima *et al.* 1997). Cette bactérie est également capable de transformer le 3-acDON mais pas d'autres trichothécènes comme le NIV et la FUS X. Une souche bactérienne anaérobie stricte (*Eubacterium* BBSH 797), isolée à partir d'une culture mixte enrichie à partir de contenu ruminal bovin, est capable de déépoxider le DON et huit trichothécènes du type A *in vitro* (Binder *et al.* 1997; Fuchs *et al.* 2002). La déépoxydation a été également observée avec cette bactérie dans des expérimentations utilisant des fragments d'intestin de porc (Schatzmayr *et al.* 2006). En revanche, Böhm (2000) a testé la capacité de différentes souches de probiotiques (*Lactobacilli*, *Bacilli*, *Saccharomyces cerevisiae*) à biotransformer les principaux trichothécènes (NIV, DON, DAS et toxine T-2), mais n'a mis en évidence aucune activité. La ZEN peut être réduite en α et β ZOL par plusieurs microorganismes (Matsuura et Yoshizawa 1985; Wu *et al.* 1992; Boswald 1995) et une souche de levure *Trichosporon mycotoxinivorans* est capable de dégrader *in vitro* à la fois la ZEN et l'ochratoxine A (Schatzmayr *et al.* 2003; Molnar *et al.* 2004).

Certains travaux récents rapportent le clonage dans des végétaux ou des microorganismes, de gènes microbiens codant des enzymes catalysant la biotransformation de certaines fusariotoxines. Takahashi-Ando *et al.* (2002) ont identifié et caractérisé une lactonohydrolase chez le champignon *Clonostachys rosea* IFO 7063 qui catalyse la conversion de la zéaralénone en un composé moins oestrogénique : le 1-(3,5-dihydroxyphényl)-10'-hydroxy-1-undecen-6'-one. Le gène codant cette enzyme a été identifié

et nommé *zhd101*. Cette biotransformation de la ZEN a été détectée dans des hôtes hétérologues, *Schizwosaccharomyces pombe* et *Escherichia coli*, dans lesquels le gène *zhd101* a été cloné. Ce gène a été également été exprimé dans du riz (Higa *et al.* 2003) et dans des levures (Takahashi-Ando *et al.* 2005).

Deux souches de champignon *Exophiala spinifera* et *Rhinocladiella atrovirens* et une bactérie gram négative (*Caulobacter* spp.), isolées à partir de grains de maïs moisis, sont capables de métaboliser la FB_1 en CO_2 de façon importante en milieu liquide. Une estérase qui mène à la formation d'aminopentol 1 (AP_1) et une activité menant à la perte du groupe amine ont été détectées. La fumonisine estérase a été clonée dans un maïs transgénique (Duvick 2001), mais pour aboutir à une détoxification totale, la désamination des fumonisines et des aminopentols reste nécessaire.

Plusieurs bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Klebsiella*, et des moisissures du genre *Cladosporium* sont capables de dégrader l'acide fusarique (Toyoda *et al.* 1988; 1991). Les produits de dégradation ne sont pas connus mais le fait que certaines souches soient capables de croître sur un milieu ne contenant que l'acide fusarique comme source de carbone pourrait indiquer une dégradation complète. Les gènes responsables de la détoxification ont été clonés et exprimés chez *Escherichia. Coli* (Toyoda *et al.* 1991; Utsumi *et al.* 1991).

2.2 La séquestration des fusariotoxines par la paroi des microorganismes

Le terme séquestration peut se définir comme la ou les interactions aboutissant à la formation d'un complexe bactérie – mycotoxine par liaisons chimiques ou par adsorption. Ce terme sera utilisé dans ce manuscrit, bien que le terme « binding » soit plus généralement utilisé dans la littérature pour l'un ou l'autre de ces mécanismes. Dans ce cas, l'effet recherché est le même que pour les adsorbants inorganiques : la complexation des mycotoxines avec les microorganismes empêchant l'absorption au niveau du TGI, facilitant l'excrétion dans les fèces et aboutissant à une réduction de leur biodisponibilité.

2.2.1 Séquestration par la paroi des levures

La paroi de *Saccharomyces cerevisiae* représente environ 30% (w/w) du poids total de la levure. Elle est organisée en une double couche dont la structure est composée essentiellement de β-1,3-D-glucanes et de mannoprotéines. Des β-1,6-D-glucanes relient la

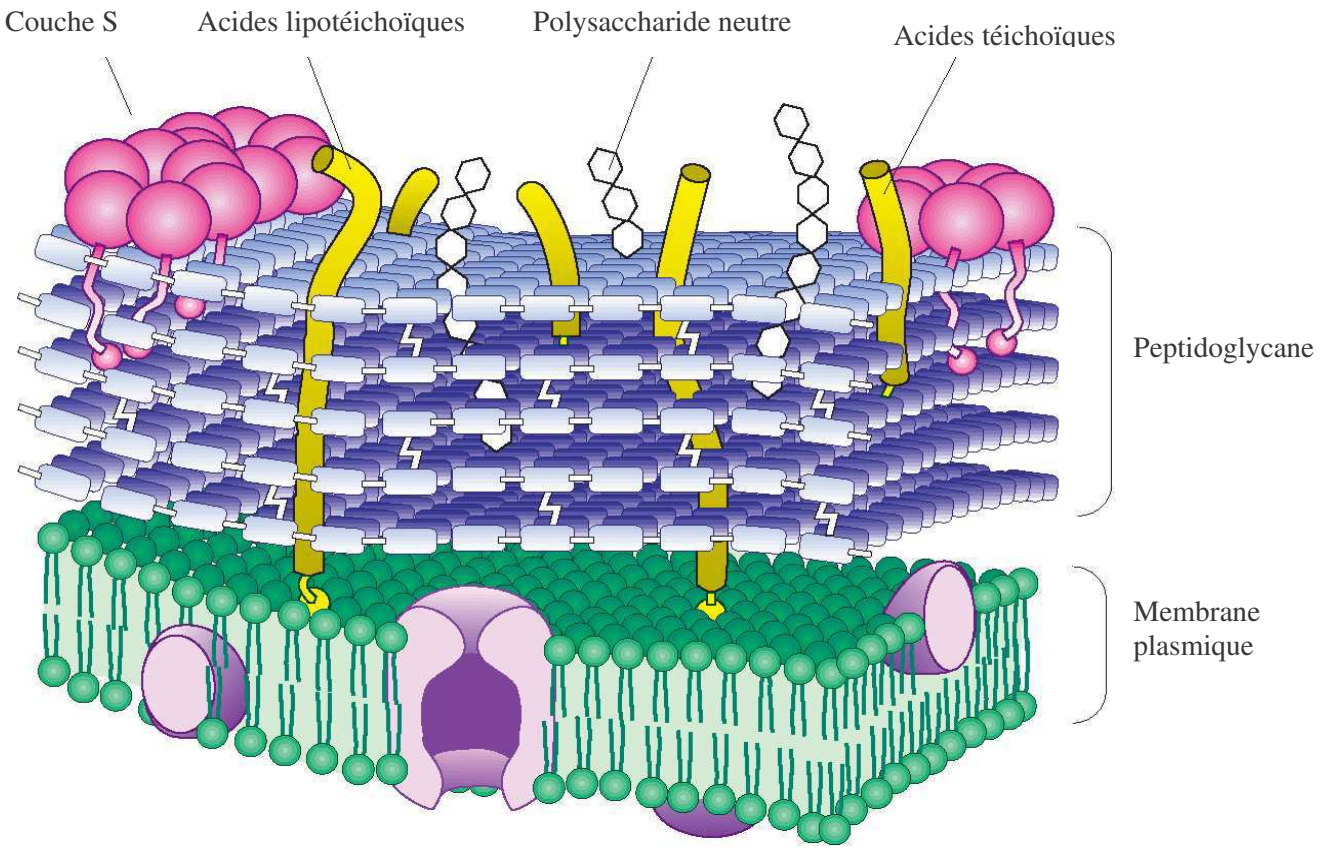


Figure 3. Vue schématique de la paroi des bactéries gram positives (d'après Delcour *et al*. 1999).

chitine, les β-1,3-D-glucanes et les mannoprotéines. Ce complexe est le constituant majeur de la paroi de *S. cerevisiae*. A partir des mannoprotéines, des chaînes latérales de mannose hautement branchées (mannanes) contribuent à la présence de nombreuses charges négatives à la surface des cellules. De plus la paroi est une structure hautement dynamique répondant rapidement aux changements de l'environnement et au stress (Klis *et al.* 2002). La composition et la nature physique de la paroi des levures peuvent donc présenter un nombre de sites très important pour l'adsorption physique de molécules.

Dans des essais *in vitro*, des glucomannanes estérifiés, extraits de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*, peuvent séquestrer jusqu'à 95% d'AFB_1, 67% de fumonisines, 77% de ZEN et dans une moindre mesure certains trichothécènes (DON, NIV, DAS et toxine T-2) (8 à 33%) (Devegowda 2000). Un certain nombre d'essais *in vivo* ont montré que ces extraits pouvaient protéger les volailles exposées à de la toxine T-2 (Raju et Devegowda 2000) et réduire les effets d'un mélange de fusariotoxines (DON, 15-acDON, ZEN, acide fusarique) chez le cheval (Raymond *et al.* 2003) et chez le porc (Swamy *et al.* 2002). En revanche, les glucomannanes estérifiés n'ont pas été efficaces pour protéger des visons exposés à la FB_1, à la moniliformine et à la ZEN (Bursian *et al.* 2004).

2.2.2 Séquestration par la paroi des bactéries fermentaires

2.2.2.1 Structure de la paroi des bactéries fermentaires

La paroi est une enveloppe rigide, externe à la membrane cytoplasmique, assurant l'intégrité et la forme des cellules bactériennes. La membrane cytoplasmique des bactéries fermentaires est semblable à celle des cellules eucaryotes et des eubactéries : une double couche (8 nm) de lipides (30 à 40 %) avec insertion de nombreuses protéines (60 à 70 %) tournées soit vers la face interne, soit vers la face externe, ou présentes dans l'entièreté de son épaisseur.

La paroi protège les bactéries des variations de pression osmotique en maintenant une pression intracellulaire très élevée. Bien que les bactéries lactiques et propioniques forment des groupes hétérogènes, elles ont une structure de paroi typique des bactéries gram positives, très différente de celle des levures. La paroi de ces bactéries est épaisse (20 à 80 nm) et offre un aspect homogène. Elle est composée essentiellement d'une matrice de peptidoglycane (PG), encore appelée muréine, qui peut représenter jusqu'à 30 % du poids sec d'une cellule et

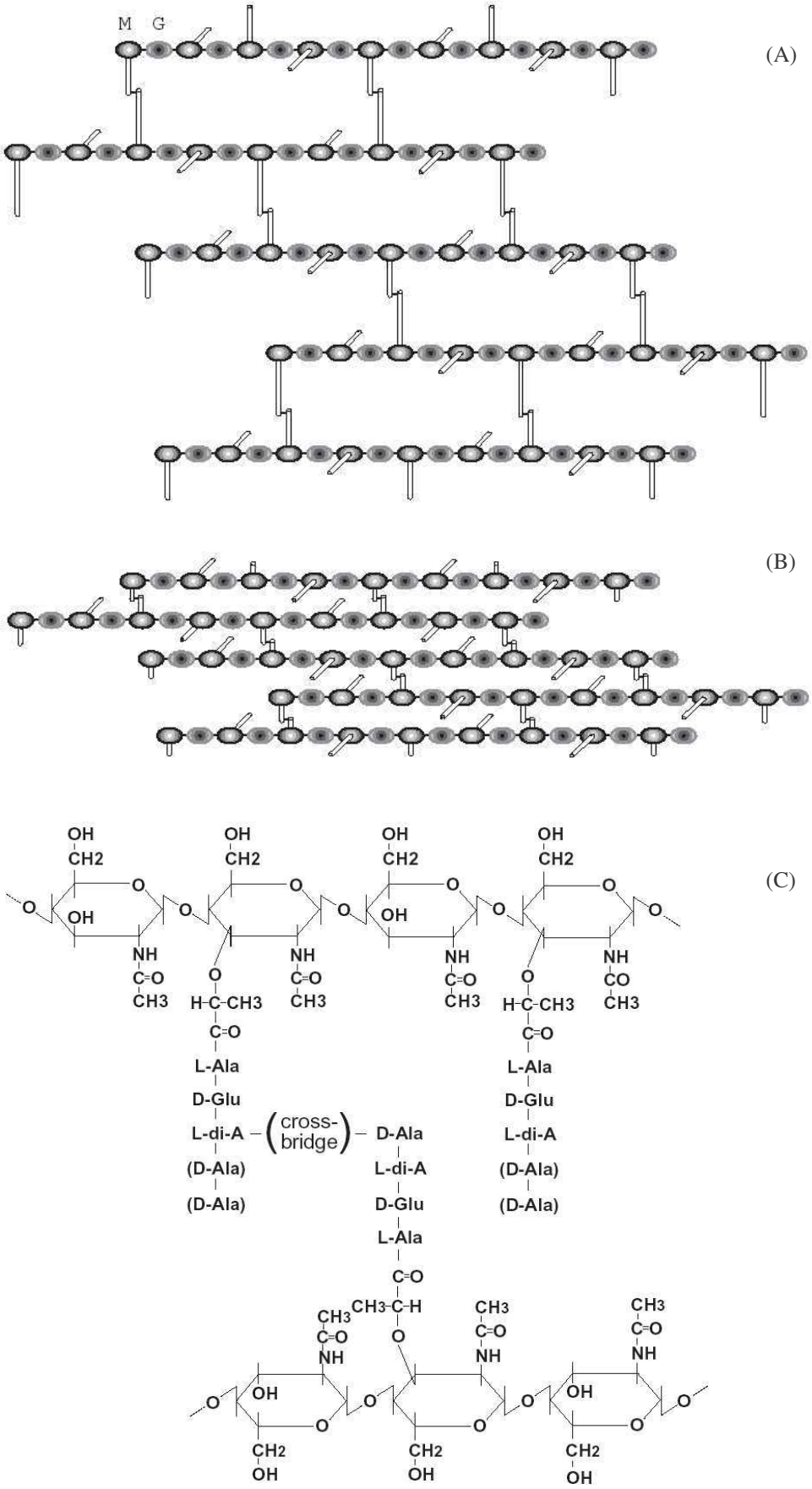


Figure 4. Représentation schématique en coupe radiale (A) et tangentielle (B) de la structure en réseau du peptidoglycane des bactéries lactiques. M = acide N-acétylmuramique ; G = N-acétylglucosamine. Les barres représentent les peptides donneurs (courtes) et accepteurs (longues). Exemple de structure détaillée d'un muropeptide de bactérie lactique (C) (d'après Delcour *et al*. 1999).

sur laquelle est fixée d'autres composants comme les acides téichoïques et lipotéichoïques, la couche protéique S et des polysaccharides neutres (**figure 3**) (Delcour *et al.* 1999).

Le PG est un hétéropolymère composé de chaînes de glycane reliées les unes aux autres par des chaînons peptidiques (**figure 4**). L'unité de base du polymère (muropeptide) comprend deux sucres aminés et au moins quatre acides aminés différents. La composition du muropeptide et la structure exacte du PG diffèrent selon les espèces bactériennes.

Chez les bactéries fermentaires comme chez toutes les eubactéries, la partie glycane est constituée de chaînes linéaires où alternent la N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM) qui est l'ester lactique de la N-acétylglucosamine. Ces résidus, sous la forme pyranoside, sont liés par des liaisons β-1,4. Après leur intégration dans la paroi, le NAG et/ou le NAM peuvent subir des modifications qui varient d'une espèce bactérienne à l'autre (Shockman et Barren 1983). Des groupes acétyl du NAG peuvent être éliminés par l'action de N-déacétylases (Vollmer et Tomasz 2002) et le C_6 du NAM peut être 6-O-acétylé (Clarke et Dupont 1992) ou substitué par des acides téichoïques ou téichuroniques. Ces variations peuvent modifier la sensibilité des bactéries à certains antibiotiques et la susceptibilité du PG aux enzymes capables de le lyser (lysozyme, muramidase, mutanolysine).

Les chaînons peptidiques sont constitués d'unités polypeptidiques fixées sur le groupe D-lactyl-carboxyl du NAM et de ponts interpeptidiques. La nature de acides aminés composant les chaînons peptidiques du PG est plus variable chez les bactéries gram positives que chez les bactéries gram négatives (Schleifer et Kandler 1972). Chez les bactéries lactiques, l'unité polypeptidique est un pentapeptide qui alterne des acides aminés de forme D et L. Dans la majorité des cas, il comprend dans l'ordre la L-alanine, l'acide D-glutamique, un acide diaminé et deux résidus de D-alanine. L'acide diaminé peut être la L-lysine ou l'acide *méso*-diaminopimélique (DAP), le précurseur de la lysine (**tableau 3**). Plus rarement, la L-ornithine peut être trouvée en position centrale et la D-sérine ou le D-lactate peut remplacer la D-alanine en C-terminal. Les ponts interpeptidiques unissent entre elles les unités polypeptidiques. Selon les espèces bactériennes, il existe des variations importantes d'une part dans la structure des ponts interpeptidiques constitués d'une simple liaison directe ou d'un polypeptide de un à six acides aminés (**tableau 3**), et d'autre part dans la fréquence avec laquelle les unités polypeptidiques sont reliées entre elles.

Tableau 3. Nature des acides aminés trouvés en position 3 du pentapeptide et dans le pont interpeptidique du peptidoglycane de quelques espèces de bactéries fermentaires et autres bactéries gram positives (d'après Schleifer et Kandler, 1972).

Espèce bactérienne	**Type peptidoglycane**	
	Acide aminé $_{\text{position 3}}$	**Pont peptidique**
Streptococcus		
thermophilus	L-Lys	L-Ala-L-Ala-(L-Ala)
pyogenes	L-Lys	L-Ala-L-Ala-(L-Ala)
faecalis	L-Lys	L-Ala-L-Ala-(L-Ala)
faecium	L-Lys	D-Asp
bovis	L-Lys	L-Thr-L-Ala-(L-Ser)
Lactobacillus		
plantarum	DAP	Ø
casei	L-lys	D-Asp
rhamnosus	L-lys	D-Asp
fermentum	L-lys	D-Asp
brevis	L-lys	D-Asp
buchneri	L-lys	D-Asp
Leuconostoc *mesenteroides*	L-lys	L-Ser-L-Ala-L-Ala
Propionibacterium	DAP ou L-L-DAP	Ø ou Gly
Bacillus *subtilis*	DAP	Ø
Micrococcus *luteus*	L-Lys	variable
Staphylococcus *aureus*	L-Lys	Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-(Gly)

Une trentaine d'unités de muropeptides s'unissent dans l'espace périplasmique pour former une chaîne de glycane, puis les chaînes nouvellement synthétisées s'insèrent dans des plans existants après la lyse de certains liens covalents par certaines autolysines (van Heijenoort 1994).

Les acides téichoïques (TA) sont des polymères anioniques de ribitol phosphate ou de glycérol phosphate. Des hydrates de carbone, des sucres aminés ou des acides aminés sont fixés sur les groupes hydroxyl des ribitols et des glycérols. La structure et l'abondance des TA sont variables selon les espèces ou les souches, le stade de croissance, le pH du milieu, la source de carbone. Le disaccharide N-acétylmannosaminyl β-1,4 glucosamine semble bien conservé, les différences étant plutôt basées sur la nature des sucres et du nombre de résidus glycérol phosphate (Archibald *et al.* 1993). Les TA se fixent sur le NAM du PG en C_6. Comme polymères anioniques, ils peuvent capter les cations, notamment les ions Mg^{2+} et peuvent créer un gradient de pH à travers la paroi en séquestrant les protons (Urrutia Mera *et al.* 1992).

Les acides lipotéichoïques (LTA) sont des molécules amphiphiles présentes à l'inrérieur et à la surface du PG. Leur structure consiste en un polyglycérophosphate attaché à un diglycéride ou à un glycolipide. Les longueurs de chaînes varient fortement et ces composés peuvent former des micelles grâce à leur nature amphiphile. Les LTA sont les principaux composants responsables de l'hydrophobicité de la paroi et, à ce titre, contribuent aux propriétés d'adhésion des bactéries (Dahlback *et al.* 1981).

Les acides téichuroniques sont des acides uroniques contenant des polysaccharides. Il s'agit aussi de polymères anioniques dus à la présence du groupe carboxyl sur l'acide uronique. Il n'y a pas de structure type, ni d'attachement type au peptidoglycane (direct ou avec intermédiaire). Leur fonction reste hypothétique (régulation d'activités enzymatiques).

Bien que leur présence dans la paroi paraisse négligeable (de < 1 % jusque 16 %), l'importance biologique des protéines associés au PG ne peut être mise en doute. Par exemple, des enzymes connues sous le nom de « Penicillin-binding proteins » (PBPs) jouent un rôle essentiel dans l'assemblage du PG (Ghuysen 1991). Cependant, la fonction et le mode d'attachement (liaisons covalentes, interactions) ne sont pleinement connus que pour un petit

nombre. Nombre de ces protéines servant de récepteurs (immunoglobulines, fibronectine, fibrinogène, collagène) sont exposées vers le milieu extérieur. Dans certains cas, ces protéines sont organisées en projections telle la protéine M de certains streptocoques liée à des acides lipotéichoïques.

L'enveloppe extérieure des bactéries fermentaires peut présenter une ou deux couches superposées de quelques nm d'épaisseur (couche S ou S-layer), formées de sous-unités protéiques, parfois glycosylées, et arrangés en réseau d'aspect cristallin tétragonal ou hexagonal. La couche S sert, pense-t-on, de filtre excluant aussi bien l'entrée que la sortie de trop grosses molécules, mais pourrait aussi posséder des fonctions antiphagocytaires et antibactériophage (Sleytr *et al.* 1993). Une des raisons de ces rôles de défense serait que la couche S masque les charges électriques négatives de la cellule bactérienne, lui conférant des propriétés hydrophobes. Chez les bactéries lactiques, la couche S n'a pour le moment été mise en évidence qu'au sein du genre *Lactobacillus* (Messner *et al.* 1997). Sa présence est rare chez les *Propionibacteria* (Lortal *et al*. 1993).

Les polysaccharides de la paroi sont des composants ubiquitaires. Ils sont généralement appelés polysaccharides neutres pour les distinguer des polysaccharides des acides téichoïques anioniques. Ces polysaccharides peuvent former la capsule, une couche hypertrophiée réalisant autour du corps bactérien une auréole, en contact direct avec la paroi. Les polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (EPS) représentent une autre catégorie de polysaccharides se différenciant de la capsule par le fait qu'ils peuvent être excrétés dans l'environnement bactérien (Whitfield 1988).

2.2.2.2 La séquestration des mycotoxines par la paroi des bactéries fermentaires

Les études publiées sur la séquestration des mycotoxines par les bactéries fermentaires sont peu nombreuses et concernent presque exclusivement l'AFB_1. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une fusariotoxine, certaines caractéristiques comme la rapidité du phénomène ou son amplification après certains traitements des bactéries semblent communes à toutes les mycotoxines testées à ce jour.

Les travaux sur la séquestration des aflatoxines par les bactéries fermentaires ont commencé lorsque, dès les années 1980, une attention particulière s'est porté sur les propriétés anticarcinogènes ou antimutagènes des bactéries lactiques (Fernandes *et al.* 1987;

Gilliland 1990). Morotomi et Mutai (1986) ont montré que des bactéries intestinales pouvaient séquestrer certains pyrolysates, des amines hétérocycliques mutagènes formées au cours de la cuisson. D'autres études menées avec des souches de *Leuconostoc* et *Streptococcus* ont montré que la paroi bactérienne était à elle seule capable de fixer ces composés (Tanabe *et al.* 1991; Zhang et Ohta 1991). Par la suite, de nombreux auteurs ont confirmé cette propriété des bactéries lactiques à séquestrer les amines hétérocycliques mutagènes à partir de souches isolées de nombreux produits alimentaires fermentés (Asahara *et al.* 1992; Hosoda *et al.* 1992; Thyagaraja et Hosono 1994; Rajendran et Ohta 1998).

Les premiers essais sur les mycotoxines ont montré que des souches de bactéries lactiques permettaient d'inhiber l'effet mutagène de l'AFB_1 dans un test utilisant *Salmonella typhimurium* TA 100 comme bactérie indicatrice (Hosoda *et al.* 1997). Dans le même temps, des travaux menés avec deux souches probiotiques, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) et *Lactobacillus rhamnosus* LC-705 (LC705), ont montré que ces bactéries étaient capables d'éliminer efficacement l'AFB_1 en milieu liquide tamponné (El-Nezami *et al.* 1996). Des différences d'élimination importantes ont été observées entre souches bactériennes, les bactéries gram négatives étant peu efficaces. Le phénomène est rapide et dépendant de la concentration cellulaire (au moins 2×10^9 UFC/ml sont nécessaires). LGG et LC705 (5×10^9 UFC/ml) sont capable d'éliminer plus de 80% d'AFB_1 à partir d'une solution à 200 µg/ml (Haskard *et al.* 1998). Par la suite, la séquestration de l'AFB_1 a été montrée avec d'autres souches de bactéries lactiques et probiotiques (Peltonen *et al.* 1998; Nagendra et Wu 1999; Oatley *et al.* 2000).

Peu d'études ont été menées pour évaluer la capacité des bactéries fermentaires à diminuer la biodisponibilité des autres mycotoxines. Cependant, LGG et LC705 semblent capables de séquestrer entre 36 et 76% d'ochratoxine A (Turbic *et al.* 2002) et les uniques travaux concernant les fusariotoxines sont détaillés ci-dessous.

Une seule étude relate la capacité des bactéries fermentaires à éliminer les TCT *in vitro* (El-Nezami *et al.* 2002a). Les souches LGG, LC705 et *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii JS* (PJS) viables ou traitées thermiquement (10^{10} UFC/3ml), incubées en présence de 20 µg toxine/ml pendant 1h à 37°C, ont éliminé des fractions significatives de certains TCT avec des différences importantes entre les souches et les toxines. Les bactéries traitées thermiquement ont éliminé généralement plus de TCT que les bactéries viables et aucun

produit de dégradation n'a été détecté par GC-MS, suggérant que l'élimination est due à leur séquestration plutôt qu'à leur biodégradation. LGG et PJS ont été plus efficaces que LC705. Ces deux souches ont été capables de séquestrer entre 18 et 93% de DON, DAS et FUS X, tandis que LC705 a séquestré uniquement le DAS et le DON (entre 10 et 64%). Le 3-acDON n'a été éliminé par aucune des trois souches testées et la toxine H-T2 uniquement par LGG et LC705 non-viables. Le DAS était le seul TCT à être séquestré très efficacement par les 3 bactéries. LGG semblait plus efficace pour éliminer les TCT de type A (DAS, toxines T-2 et HT-2) que ceux du groupe B, tandis que cette tendance était inversée avec PJS.

La capacité de LGG et LC705 à éliminer la ZEN et son dérivé l'α ZOL a également été testée en milieu de culture contenant 2 µg/ml de ces deux fusariotoxines (El-Nezami *et al.* 2002b). Aucun produit de dégradation n'a été détecté après 72h d'incubation. Entre 38 et 46% de toxine ont été éliminés et retrouvés dans les culots bactériens, indiquant que la ZEN et l'α-ZOL sont associés à la surface des bactéries et non métabolisés. Le phénomène est rapide, concentration cellulaire dépendant et température non-dépendant. Un minimum de 10^9 cellules/ml est nécessaire à une élimination significative. L'incubation simultanée de ZEN et α-ZEN diminue le taux de séquestration, ce qui indique qu'il y a compétition à de mêmes sites de fixation. Le pourcentage de toxines séquestrées reste stable pendant au moins 72h.

Il n'y a aucune étude sur la séquestration des autres fusariotoxines par les bactéries fermentaires, notamment les fumonisines.

Les études menées afin de mieux caractériser le mécanisme de séquestration, et déterminer les composants de la paroi bactérienne et le type d'interaction impliqués dans la formation du complexe bactérie-mycotoxine, se sont largement focalisées sur l'AFB_1. En s'inspirant des travaux réalisés sur la séquestration des amines hétérocycliques (Sreekumar et Hosono 1998), quelques équipes ont étudié l'influence de différents traitements physico-chimiques et enzymatiques des bactéries sur le taux de séquestration de l'AFB_1 : des traitements acide (HCl 1M) ou thermiques (1h, 100°C ; autoclavage) de LGG et LC705 augmentent la fraction d'AFB_1 éliminée (El-Nezami *et al.* 1998b). L'irradiation par UV, la sonication et le traitement à l'éthanol ou au KCl ne modifient pas le niveau d'élimination, tandis que les traitements alcalins (NaOH et Na_2CO_3) et à l'isopropanol le réduisent. La viabilité des cellules n'étant pas nécessaire à l'élimination de la mycotoxine, un phénomène physique lié à la surface des bactéries lactiques a été suggéré. L'utilisation de la méthode

ELISA par inhibition compétitive indirecte a confirmé que la séquestration s'effectue en surface des bactéries puisque l'AFB_1 séquestrée est accessible aux anticorps monoclonaux spécifiques (Haskard *et al.* 2001). Les traitements thermique et acide augmentant la capacité d'élimination, l'altération de la paroi qui en résulte pourrait faciliter l'accès de l'AFB_1 aux sites de fixation en comparaison à une paroi intacte. L'action du *m*-périodate, un agent oxydant les groupes *Cis*-OH des aldéhydes et des acides carboxyliques, et de la pronase E, une protéase particulièrement aspécifique de *Streptomyces griseus* ont entraîné la plus forte inhibition de la séquestration, suggérant un rôle prépondérant des composés hydrocarbonés et/ou des protéines (Haskard *et al.* 2000). En revanche, comme l'action de la lipase ne modifie pas le taux d'AFB_1 séquestrée, les LTA ne semblent pas impliqués dans le mécanisme de séquestration. D'une manière générale, les traitements chimiques et enzymatiques testés n'inhibent que partiellement la séquestration. Ceci pourrait s'expliquer par l'implication de plusieurs composants de la paroi bactérienne dont certains ne seraient pas inactivés par les traitements utilisés. Des essais récents montrent qu'un extrait de la paroi de LGG partiellement purifié peut séquestrer l'AFB_1 de façon similaire aux cellules entières (environ 80%), tandis qu'un extrait d'EPS n'en a séquestré aucune quantité détectable. Ces résultats suggèrent que l'AFB_1 pourrait être liée au PG ou à des composants finement associés à celui-ci (Lahtinen *et al.* 2004). Les interactions hydrophobes, mises en évidence par l'action de l'urée, un agent anti-hydrophobe, semblent majoritaires dans le mécanisme de séquestration de l'AFB_1. En revanche, les liaisons hydrogènes apparaissent peu impliquées car la fraction d'AFB_1 séquestrée n'est pas significativement différente à des pH compris entre 2,5 et 8,5 (Haskard *et al.* 2001). Les interactions électrostatiques seraient également mineures puisque la présence d'ions mono- et divalents ($CaCl_2$ et NaCl) n'ont pas d'effet sur le niveau de séquestration. Le mécanisme de séquestration apparaît réversible. La stabilité du complexe bactérie-AFB_1 aux lavages aqueux est variable selon les souches, et les traitements acides et thermiques augmentent la fraction restant liée (Haskard *et al.* 2001).

Une approche similaire a été utilisée pour caractériser la séquestration de la ZEN (El-Nezami *et al.* 2004). Celle-ci semble se lier principalement aux composés hydrocarbonés de la paroi bactérienne. Les traitements thermique (100°C, 1h) et acide (HCl 2M pendant 1h) augmentent fortement le taux de séquestration des deux toxines par rapport aux bactéries viables (El-Nezami *et al.* 2002b). L'action de la lipase n'a pas eu d'effet tandis que le prétraitement à l'urée a inhibé de 6 à 11% la séquestration, suggérant que des interactions hydrophobes pourraient être impliquées (El-Nezami *et al.* 2004). Aucun effet significatif du

pH (entre 3,5 et 8,5) n'a été observé avec des cellules de LGG viables, traitées thermiquement ou à l'acide. Les sites de fixation n'étaient pas saturés avec la concentration maximale utilisée (20 µg/ml). D'autre part, des essais de désorption par des lavages aqueux successifs ont montré que la courbe ZEN liée/ZEN libre *versus* ZEN liée n'est pas linéaire, suggérant que plusieurs modes de séquestration pourraient être opérants avec des stabilité différentes. Le prétraitement avec la pronase E n'ayant pas eu d'effet sur la séquestration avec des cellules viables mais en ayant eu avec des cellules non-viables (chaleur, acide), les auteurs ont suggéré que de nouveaux sites, exposés après traitements thermique et acide, pourraient être de nature protéique.

Parallèlement aux études *in vitro*, des études *ex vivo* et *in vivo* ont été menées afin d'évaluer la capacité de ces souches à réduire la biodisponibilité de l'AFB_1 dans l'organisme. L'efficacité de plusieurs souches a été observée *in vivo* dans le liquide de la lumière intestinale au niveau du duodénum de poulet (El-Nezami *et al.* 2000). Au cours de ces essais, jusqu'à 54 % de réduction de l'AFB_1 injectée aussitôt après l'administration de 10^{10} cellules de LGG a été observée dans la fraction soluble du liquide intestinal, ainsi qu'une forte diminution de la concentration de cette mycotoxine au niveau des tissus intestinaux. Kankaapaa *et al.* (2000) ont montré que la séquestration de l'AFB_1 par LGG diminue la capacité d'adhésion des bactéries de 30% à 5% dans un modèle Caco-2. Ce phénomène de compétition a également été observé au niveau de la muqueuse intestinale de porc *in vitro* (Gratz *et al.* 2004). Ces études suggèrent que les sites de séquestration et d'adhésion pourraient être de même nature et que le complexe AFB_1-LGG pourrait être facilement excrété. Des essais *ex vivo* menés en utilisant une anse duodénale de poulet montrent plutôt un retardement de l'absorption en présence de LGG (Gratz *et al.* 2003; 2005). En revanche, cette même souche semble efficace pour protéger des rats des effets de l'AFB_1 qui est significativement plus excrétée dans les fèces qu'en absence de bactéries (Gratz *et al.* 2006). Des taux significativement différents d'AFB_1 ont été observé dans les fèces d'humains exposés à cette mycotoxine (région rurale humide d'Egypte) auxquels il avait été administré un mélange de souches probiotiques (LGG et PJS) (El-Nezami *et al.* 2000b). La diminution de l'excrétion urinaire d'AFB-N-7-guanine, un marqueur d'exposition à l'AFB_1, a été observée chez l'homme lors de la prise d'un mélange de LC-705 et PJS, montrant une baisse de la biodisponibilité de l'AFB_1 (El-Nezami *et al.* 2006).

Tableau 4. Réduction de la concentration de zéaralénone (ZEN) et de déoxynivalénol (DON) par différents produits commerciaux utilisant des microorganismes ou des enzymes de dégradation dans un test *in vitro* (Döll et al. 2004)

Produit	Composition	ZEN éliminée (%)	DON éliminé (%)
Mycosorb® Extra [1]	Glucomannane estérifié (*S. cerevisaiae*)	20 ± 4	0 ± 5
Klinosan® [2]	Zéolite et extrait de levure	17 ± 2	1 ± 4
Mycofix® [3]	Enzymes de dégradation + adsorbant	13 ± 12	1 ± 1
Likratox® [4]	Enzymes de dégradation + adsorbant	5 ± 2	2 ± 3

[1] Alltech GmbH, Bad Segeberg, Allemagne; [2] Unipoint AG, Truttikon, Suisse; [3] Biomin GmbH, Herzogenburg, Autriche; [4] Linzer Kraftfutter GmbH & Co, Linz, Autriche

Ces travaux montrent que les bactéries fermentaires pourraient être potentiellement adaptées à la détoxification des ensilages. La charge microbienne nécessaire à la séquestration des principales mycotoxines, la stabilité du complexe bactérie-mycotoxine et la capacité réelle à diminuer la biodisponibilté des toxines doivent néanmoins être étudiés pour évaluer l'applicabilité de ces agents biologiques.

Bien que les méthodes biologique en soient encore au stade du développement, quelques produits (Mycofix®, Mycosorb®) commencent à être commercialisés dans certains pays. Les études concernant leur efficacité sont toutefois contradictoires. Le produit Mycofix®plus (Biomin) est actuellement le plus élaboré et intègre différentes stratégies de détoxification. Il combinerait i) l'adsorption des aflatoxines par un adsorbant inorganique ii) la biodégradation des TCT par la bactérie *Eubacterium* BBSH 797, mais aussi celle de la ZEN et de l'OTA par la levure *Trichosporon mycotoxinivorens*, iii) la réduction des effets néfastes de certaines mycotoxines avec divers extraits végétaux et d'algues stimulant le système immunitaire (polysaccharides, alacaloïdes), ayant un effet protecteur du foie ou une activité anti-inflammatoire (flavonoïdes, triterpènes, saponines, caroténoïdes). Cependant, des études comparatives semblent montrer que si l'adsorption des aflatoxines est réalisée efficacement, les propriétés de dégradation des fusariotoxines ne semblent pas ou peu se vérifier en pratique. Une étude *in vitro* simulant les conditions du TGI de porc montre que le produit Mycofix®plus n'est pas efficace pour détoxifier le DON et la ZEN (Doll *et al.* 2004) (**tableau 4**). Le même constat a été fait *in vivo* avec des boeufs en croissance (Danicke *et al.* 2002), chez les poulets (Danicke *et al.* 2001) et chez le porc (Danicke *et al.* 2004b; Doboszynska *et al.* 2004). De plus, des effets négatifs sur les performances des poulets, indépendants de la concentration en mycotoxines dans l'alimentation, ont été rapportés (Danicke *et al.* 2003). En revanche, ce produit est le seul parmi quatre (Mycofix®plus, Mycosorb®, MycoAd®, et Zeolex®) à réduire les effets de la toxine T-2 chez le poulet (Diaz *et al.* 2005).

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

La contamination des ensilages par les fusariotoxines intervient au champ en dehors de tout problème de conservation. Le développement des *Fusaria* et la production de fusariotoxines étant étroitement liés aux conditions climatiques (température et pluviométrie), la contamination ne peut être totalement maîtrisée. Malgré les efforts de prévention basés sur le respect de certaines pratiques agronomiques comme la rotation des cultures et le labour, la présence de fusariotoxines dans les ensilages est régulièrement observée. Le risque de contamination est fortement accru lorsque le maïs est présent dans la rotation des cultures ou en monoculture (Thomas 2005), ce qui est souvent le cas lors de la production de maïs ensilage. Bien que les données soient peu nombreuses, les fusariotoxines présentes dans les végétaux à la mise en silo semblent stables lors du processus d'ensilage (Lepom *et al.* 1988; 1990a).

La conception des ensilages *in situ* à la ferme est un facteur aggravant puisqu'ils ne sont généralement contrôlés qu'en cas de suspicion d'intoxication. De plus, le diagnostic d'une contamination par les fusariotoxines n'est pas toujours facile à établir car certains symptômes peuvent être similaires à d'autres maladies infectieuses et métaboliques.

Les conséquences économiques résultant de la présence de fusariotoxines à des teneurs trop élevées dans la ration des animaux d'élevage peuvent être dues à une diminution des performances zootechniques (diminution de la production laitière et/ou du gain de poids, infertilité, etc …), et à divers coûts supplémentaires (analyse des aliments, frais vétérinaires, utilisation d'additifs) (D'Mello *et al.* 1999). Ces pertes sont difficiles à évaluer car les conséquences de la présence de fusariotoxines dans l'alimentation animale ne sont pas toujours clairement identifiées et pourraient donc être sous-estimées.

Les fusariotoxines peuvent également poser des problèmes de santé animale. Bien que, d'une manière générale, les ruminants soient considérés comme plus résistants aux effets des mycotoxines que les espèces monogastriques, notamment le porc, les effets liés à une exposition prolongée à de faibles doses et aux synergies entre mycotoxines lors d'une multi-contamination sont encore mal connus. De plus, même si le transfert et l'accumulation de résidus des fusariotoxines majeures (DON, ZEN, toxine T-2, FB_1) dans le lait et les tissus comestibles sont généralement considérés comme faibles (< 1%) (Cote *et al.* 1986a; Prelusky *et al.* 1990; Prelusky et Trenholm 1992; Hammer *et al.* 1996), les aspects liés à la sécurité alimentaire ne sont pas à négliger. De nombreuses autres fusariotoxines, moins étudiées,

peuvent être présentes dans l'alimentation des animaux sans qu'aucune donnée ne soit disponible concernant leur transfert dans les produits animaux.

Depuis le 17 août 2006, la commission de l'Union Européenne recommande des teneurs maximales en DON, ZEN, OTA, fumonisines, toxines T-2 et HT-2 dans les aliments destinés à la nutrition animale (2006/576/CE) (**annexe 13**). Ces recommandations portent sur les denrées à base de maïs, les céréales et les aliments complémentaires. Or, des professionnels semblent s'alarmer du fait que certaines de ces teneurs maximales ne sont pas réalistes dans certaines zones géographiques comme le taux de fumonisines B_1 et B_2 dans le maïs en Italie (Pasti 2006). Cet auteur souligne également l'impact probable du réchauffement climatique sur la présence accrue de fumonisines dans ces régions. La production de fumonisines étant souvent associée à un stress hydrique, la répétition d'épisodes caniculaires conjuguée à une raréfaction des réserves en eau dont la production de maïs est hautement consommatrice pourrait effectivement amplifier ce problème.

Face à une législation plus contraignante en nutrition humaine et animale, la plus forte résistance des ruminants par rapport aux espèces monogastriques pourrait conduire les professionnels à réserver les denrées les plus contaminées à l'alimentation des ruminants. Cependant, l'exposition chronique de ces animaux aux mycotoxines pourrait avoir des conséquences importantes comme une fragilisation du système immunitaire ou un impact sur le transfert de ces composés dans les produits animaux.

L'utilisation des végétaux contaminés dans la filière bioéthanol a été évoquée mais il semble que les mycotoxines perturbent les levures qui transforment l'amidon en alcool pendant le processus de fermentation, ce qui conduit à une baisse de rendement en éthanol. De plus, les mycotoxines se concentrent dans les drèches, ce qui risquerait de les rendre impropres à l'utilisation en alimentation animale puisqu'elles devront également répondre à la législation précédemment évoquée.

Face à une contamination importante, le recours à des méthodes de détoxification peut être envisagé. Or, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode pratique, économique et spécifique pour détoxifier les fourrages contaminés. Des méthodes physiques et chimiques ont été développées principalement pour la détoxification d'aliments destinés à la nutrition humaine contenant des aflatoxines. Certaines d'entre elles sont utilisées industriellement pour

des applications spécifiques comme l'ammoniation des tourteaux d'arachides, le tri mécanique de pistaches et de figues ou l'ozonation dans la filière « grains-farine » (Scott 1998).

Pour le traitement des ensilages, toutes ces méthodes sont soit impraticables compte tenu de la nature physique des fourrages, soit trop onéreuses, trop ou pas assez spécifiques ou encore insuffisamment efficaces. La faible valeur marchande des ensilages, les volumes à traiter et la forte hétérogénéité de ce type d'aliment rendent difficile le développement d'une solution satisfaisante. Une méthode déjà utilisée pour la détoxification des aliments du bétail contaminés par certaines mycotoxines est l'ajout d'adsorbants inorganiques comme la bentonite. La capacité d'adsorption de ce type d'agent permet de réduire la biodisponibilité des aflatoxines (Ramos *et al.* 1996; Diaz *et al.* 2003) et de réduire significativement leurs effets *in vivo* chez une large variété d'animaux d'élevage (Huwig *et al.* 2001). Cependant, leur efficacité semble très limitée pour adsorber les fusariotoxines au taux maximal d'inclusion recommandé (Williams *et al.* 1994; Ramos *et al.* 1996). De plus, l'ajout de trop fortes quantités d'agent adsorbant peut conduire à une diminution importante de la biodisponibilité de certains micronutriments essentiels de la ration comme les vitamines.

Les méthodes biologiques, utilisant certaines propriétés des microorganismes, semblent prometteuses pour la détoxification de certains aliments, en particulier fermentés. Bien que quelques produits commencent à apparaître sur le marché, ces méthodes sont encore, dans une large mesure, en développement. La détoxification par les microorganismes peut se faire de deux manières: soit par biotransformation des fusariotoxines en résidus moins toxiques, soit par leur séquestration au niveau de la paroi microbienne (Styriak et Conkova 2002). Les microorganismes (bactéries et champignons), dont la capacité à biotransformer certaines fusariotoxines a été montrée (Cf. synthèse bibliographique, III-2.1.2), ont été généralement isolés de biotopes complexes dont le rôle détoxifiant est connu (contenu ruminal ou sol). Si quelques souches pures sont effectivement capables de produire *in vitro* des composés moins toxiques que les molécules-mères, leur efficacité *in vivo* n'est pas toujours garantie (Doll *et al.* 2004). De plus, pour être actifs dans les ensilages, ces microorganismes doivent être viables et en densité suffisante dans la masse. Or, de tels microorganismes sont généralement anaérobies stricts ou de culture difficile, si bien qu'une utilisation efficace pourrait nécessiter un apport microbien massif et homogène. De même, l'utilisation des capacités de

séquestration des glucomannanes estérifiés extraits de la paroi de levures apparaît peu aisée dans les ensilages compte tenu des volumes à traiter.

L'hypothèse d'une détoxification par la microflore fermentaire pourrait apparaître comme une solution plus économique et plus pratique. Agents naturels de la fermentation, ces microorganismes sont capables de croître fortement au cours du processus d'ensilage et pourraient être actifs de façon plus homogène. Les bactéries fermentaires entrent également dans la composition des conservateurs biologiques d'ensilage utilisés pour améliorer la qualité de la conservation (Weinberg et Muck 1996a). Elles assurent une croissance rapide de la flore fermentaire vis-à-vis de la microflore indigène, contribuent à la stabilisation précoce des silos et améliore la digestibilité de l'ensilage (Ely *et al.* 1981; Harrison *et al.* 1989; Andrieu et Demarquilly 1998). De plus, certaines espèces hétérofermentaires comme *Lactobacillus buchneri* peuvent améliorer la stabilité aérobie des ensilages (Filya 2003) et certaines souches inhiberaient la croissance de la mycoflore toxinogène de conservation (Gourama et Bullerman 1995; Gourama 1997). Les bactéries lactiques apportent également d'autres bénéfices. L'alimentation des animaux avec des ensilages traités avec certains inoculants peut améliorer de 5 à 11% les performances zootechniques comme l'ingestibilité, la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière (Muck 1993; Raman et Sharma 1998; Salawu *et al.* 2001; Khuntia et Chaudhary 2002; Kung *et al.* 2003). La cause de ces améliorations n'est pas clairement élucidée mais des travaux récents suggèrent un effet probiotique de certains inoculants affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (Weinberg 2003; Weinberg *et al.* 2004b; Gollop *et al.* 2005). Pour une utilisation comme additif, les bactéries fermentaires sont « generally regarded as safe » (GRAS).

Aucune étude ne relate la biotransformation des fusariotoxines par des souches pures de bactéries fermentaires et les données de la littérature disponibles ne suggèrent pas que cette propriété ait été activement recherchée. Bien que quelque peu aléatoire et laborieux, le criblage d'un nombre important de souches mérite donc d'être réalisé si on rapporte ce travail aux enjeux et aux possibles applications. En revanche, la capacité de la paroi de *Lactobacillus* et *Propionibacterium* à séquestrer la ZEN et certains trichothécènes en plus de l'AFB_1 et de l'OTA a été récemment montrée avec quelques souches *in vitro* (El-Nezami *et al.* 2002a; El-Nezami *et al.* 2002b). Cependant, cette activité n'a été étudiée que chez un nombre très réduit de souches bactériennes et la séquestration des fumonisines n'a jamais été évoquée. De plus, il y a des besoins de connaissances sur la capacité de ces bactéries à séquestrer les

fusariotoxines dans les conditions d'acidité d'un ensilage bien conservé et à des concentrations bactériennes compatibles avec leur potentiel de croissance dans les ensilages. Il s'agit également de savoir si le niveau de cette activité est identique chez toutes les souches de bactéries fermentaires ou si des différences peuvent être observées entres genres, espèces, souches, ouvrant la voie à la sélection de microorganismes particulièrement actifs. Plus en aval, le devenir du complexe bactérie–fusariotoxine dans l'organisme des animaux de ferme, en particulier chez les ruminants et le porc, est inconnu. Enfin, les données sur le mécanisme de séquestration ne concernent actuellement que l'AFB_1 (Haskard *et al.* 2000; Lahtinen *et al.* 2004) et la ZEN (El-Nezami *et al.* 2004) et reste encore, dans une large mesure, incompris.

L'objectif de cette thèse est d'explorer la capacité des bactéries fermentaires à biotransformer et/ou séquestrer les fusariotoxines en vue d'une application à la détoxification des ensilages de maïs. Quatre objectifs principaux ont été ainsi définis :

i) La mise en place d'outils analytiques sous la forme d'un test *in vitro* simple permettant de quantifier simultanément la biotransformation et la séquestration de quatre fusariotoxines majeures (DON, ZEN, FB_1 et FB_2) par les bactéries fermentaires dans des conditions simulant les ensilages de maïs en terme de substrat, d'acidité et de concentration bactérienne

ii) La réalisation d'un criblage de souches de bactéries fermentaires issues de diverses collections et représentatives des espèces fréquemment isolées des ensilages. A l'issue de cette phase, quelques souches particulièrement actives ont été sélectionnées pour les essais sur la stabilité du complexe bactérie – fusariotoxine et le mécanisme de séquestration.

iii) L'étude de la stabilité du complexe bactérie – fusariotoxine dans des conditions simulant le TGI des animaux de fermes. Pour les ruminants, une étude de stabilité a été réalisée dans du contenu ruminal. Ces travaux ont bénéficié de l'expertise de notre laboratoire pour la simulation *ex vivo* de cycles de fermentation ruminale en conditions contrôlée (anaérobiose, température, agitation, …). La stabilité du complexe a également été mesurée dans des conditions simulant l'environnement post-ruminal du TGI permettant d'extrapoler l'étude aux animaux monogastriques.

iv) Enfin, le mécanisme de séquestration des fusariotoxines par la paroi des bactéries fermentaires a été étudié en tentant de déterminer quel(s) composant(s) de la paroi bactérienne

et quel(s) groupement(s) des toxines sont impliqués dans cette interaction. Pour ces essais, les fumonisines ont été choisies comme fusariotoxines d'étude. L'amélioration des connaissance sur ce mécanisme pourrait permettre à terme de sélectionner des souches bactériennes en fonction de leur physiologie (structure séquestrante de la paroi) et de mieux appréhender la force des liaisons mises en jeu dans le complexe bactérie – fusariotoxine.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. ELIMINATION DES FUSARIOTOXINES PAR LES BACTERIES FERMENTAIRES

1. Mise au point d'un test *in vitro* pour le criblage de souches bactériennes

Très peu de souches de bactéries fermentaires ont été testées pour leur capacité à éliminer les fusariotoxines (Cf. synthèse bibliographique III-2). *Lactobacillus rhamnosus* (LGG et LC705), connues pour leur effet probiotique, sont capables de séquestrer jusqu'à 52% de ZEN et d'α-ZOL en milieu tampon à une concentration bactérienne de 10^{10} UFC/ml (El-Nezami *et al*. 2002b). Ces deux mêmes souches et la souche *Propionibacterium freundenreichii* ssp. s*hermanii* JS (PJS) peuvent également séquestrer certains TCT à des niveaux variables selon les souches et les dérivés de TCT (El-Nezami *et al*. 2002a). En revanche, aucune étude montrant la capacité des bactéries fermentaires à éliminer les fumonisines n'a été publiée. D'autre part, très peu d'études ont exploré la capacité de ces bactéries à biotransformer les fusariotoxines puisque ces travaux ont surtout été menés en milieu tampon.

L'objectif de cette partie est de fixer les paramètres d'un test *in vitro* permettant de mesurer simultanément la séquestration et une éventuelle biotransformation des fusariotoxines majeures par les bactéries fermentaires dans des conditions simulant les ensilages de maïs. Ce test doit être relativement simple et rapide pour cribler un grand nombre de souches.

Un pré-criblage a été réalisé sur une trentaine de souches appartenant à six genres de bactéries fermentaires (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* et *Propionibacterium*). L'objectif de ce pré-criblage est i) de disposer d'une vue d'ensemble sur la capacité d'élimination (séquestration et/ou biotransformation) des différents genres bactériens, ii) de sélectionner quelques souches actives pour l'étude des facteurs pouvant influencer l'élimination des fusariotoxines, iii) d'orienter le choix des souches à tester lors du criblage. Dans un souci de simplification, nous avons testé le DON et un mélange de FB_1 et FB_2, tandis que la ZEN n'a pas été utilisée pour ces premiers essais.

A l'issu du pré-criblage, trois souches ayant montré des taux d'élimination importants, *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* (LDB) et *Leuconostoc mesenteroides* (LM) ont été sélectionnées pour l'étude de l'influence de certains

facteurs comme le pH du milieu, la concentration cellulaire, le stade de croissance et la viabilité des bactéries, sur le niveau d'élimination des fusariotoxines.

1.1 Protocole expérimental

Elimination des fusariotoxines par les bactéries fermentaires. Essais préliminaires pour la mise au point d'un test in vitro en vue d'un criblage de souches (**annexe 7**)

1.2 Article - Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*.

Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*

V. Niderkorn[1,2], H. Boudra[1] and D.P. Morgavi[1]

1 French Institute for Agricultural Research (INRA), Clermont-Fd-Theix Research Centre, Herbivore Research Unit, Saint Genès-Champanelle, France
2 Lallemand S.A.S, Blagnac, France

Keywords
binding, fermentative bacteria, *Fusarium*, mycotoxins, probiotic, silage.

Correspondence
V. Niderkorn and H. Boudra, French Institute for Agricultural Research (INRA), Clermont-Fd-Theix Research Centre, Herbivore Research Unit, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France. E-mail: vniderk@clermont.inra.fr, hboudra@clermont.inra.fr

2005/1166: received 4 October 2005, revised 7 January 2006 and accepted 9 February 2006

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02958.x

Abstract

Aims: *Fusarium* toxins can occur in conserved forages impairing farm animal performances and health. On-farm biological decontamination methods could be an alternative to traditional physico-chemical methods. In this work, the ability to remove *Fusarium* toxins by fermentative bacteria was evaluated *in vitro*.
Methods and Results: Twenty-nine strains of lactic (LAB) and propionic acid bacteria (PAB) were tested for their ability to remove deoxynivalenol (DON) and fumonisins B_1 and B_2 (FB_1, FB_2) from an acid, pH 4, medium. Mycotoxin removal was widespread for LAB, but differences among strains were large. Removal was up to 55% for DON, 82% for FB_1 and 100% for FB_2. Selected strains were also capable of removing up to 88% zearalenone. The PAB strains were less efficient than the LAB. Binding, not biodegradation appeared to be the mode of action, as no toxin derivatives were observed and removal was not impaired in nonviable bacteria. Binding was not affected by pH, except for fumonisins that decreased to nearly 0% at neutral pH.
Conclusions: Selected fermentative bacteria are able to bind main *Fusarium* mycotoxins.
Significance and Impact of the Study: The binding ability of selected strains could be used to decrease the bioavailability of toxins in contaminated silages.

Introduction

Fusaria are common plant contaminants in temperate regions (Mills 1989; Seeling and Danicke 2005). They are known to produce a wide variety of mycotoxins, including zearalenone (ZEN), fumonisins (FB) and several trichothecenes, such as deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) and T-2 toxin (T-2). These toxins can occur in conserved forages, such as silages impairing animal performances and health (Scudamore and Livesey 1998; Boudra *et al.* 2002). *Fusarium* toxins induce a variety of toxic responses in animals, including neurotoxicity, hepatotoxicity and immunotoxicity (Eriksen and Pettersson 2004). In addition, they have been reported to have carcinogenic and oestrogenic effects (Gelderblom *et al.* 1991; D'Mello *et al.* 1999).

Fusarium mycotoxins are produced during the maturation of cereal crops in the field or immediately post-harvesting. As toxin production is modulated by environmental factors, the prevention of contamination cannot be fully implemented. Therefore, it is suitable that detoxification methods are developed for the inactivation of toxins produced during the pre-harvest stages of crop production. Although physical and chemical detoxification methods have been reported (Young *et al.* 1986; Trenholm *et al.* 1992; Huwig *et al.* 2001), they are expensive and not practical to implement on farms. An alternative strategy is the use of micro-organisms able to degrade or bind toxins. Because of their fermentative role, lactic acid bacteria (LAB) and propionic acid bacteria (PAB) could be particularly well adapted for the detoxification of silage. Indeed, these bacterial groups are already used as additives to

© 2006 The Authors

improve the silage-making process and to inhibit the proliferation of spoilage micro-organisms.

The ability of fermentative bacteria to bind dietary carcinogens and mutagens is known (Morotomi and Mutai 1986; Zhang and Ohta 1991; Thyagaraja and Hosono 1994; Sreekumar and Hosono 1998; Rajendran and Ohta 1998). Regarding mycotoxins, specific dairy strains have been shown to bind aflatoxin B_1 (AFB_1) from liquid solutions (El-Nezami *et al.* 1998; Haskard *et al.* 2000; Lahtinen *et al.* 2004). Recently, El-Nezami *et al.* (2002a,b) also showed that some strains bound several trichothecenes and ZEN *in vitro*. However, the removal of *Fusarium* toxins by fermentative bacteria at acid pH, similar to that of silage, is not well known.

The objective of this study was to investigate the removal of main *Fusarium* toxins, including fumonisins that have never been considered by fermentative bacteria. A screening of 26 strains of LAB and three PAB was done to test the removal (biotransformation or binding) of DON, FB_1 and FB_2 from culture medium. The nature of the detoxification and the effects of pH and bacterial concentration on the removal of DON, NIV, FB_1, FB_2 and ZEN were further examined on selected strains.

Materials and methods

Bacterial strains and media

Lactobacillus rhamnosus strain GG ATCC 53103 (LGG) was obtained from LGC Promochem, Molsheim, France. *Lactobacillus helveticus* 46 and 72, *Lactobacillus jugurti* 63, *Lactococcus lactis* 170, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* C3 and *Streptococcus thermophilus* NG40Z and C5 were obtained from the Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA, Thivernal-Grignon, France. *Lactococcus lactis* CS 43, CS 202 and CS 197 were obtained from the Research Laboratory for Animal Husbandry, INRA, Corte, France. All other strains were obtained from Lallemand SAS, Blagnac, France. For long-term conservation, all strains were stored at −80°C in 30% glycerol.

De Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS) (Oxoïd Ltd, Basingstoke, UK) was used for the culture of *Lactobacilli*, *Pediococci* and *Leuconostoc*. M17 broth (Oxoïd Ltd) + 10% lactose was used for the culture of *Lactococci* and *Streptococci*. Yeast extract lactate (YEL) medium, prepared according to Malik and Vedamuthu (1968), was used for the culture of *Propionibacteria*.

Mycotoxins

DON, NIV, ZEN, FB_1 and FB_2 were purchased from Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany. Toxins were dissolved in acetonitrile (DON), methanol (NIV and ZEA) or acetonitrile–water in the ratio 1 : 1 (v/v) (fumonisins). Concentration was determined by measuring the absorbance at 218 nm for DON ($\varepsilon = 6406$ mmol^{-1} cm^2) and NIV ($\varepsilon = 6307$ mmol^{-1} cm^2) and at 274 nm for ZEA ($\varepsilon = 13\,910$ mmol^{-1} cm^2). As spectrophotometry is not possible with FB_1 and FB_2, these compounds were dissolved in an exact volume of acetonitrile–water in the ratio 1 : 1 (v/v) to achieve the desired concentration. The most common derivative of DON, deepoxy-deoxynivalenol (DOM) was purchased from Biopure, Tulin, Austria. The most common derivatives of fumonisins, aminopentols (HFB_1 and HFB_2), were obtained by hydrolysis of FB_1 and FB_2 according to Pagliuca *et al.* (2005).

Determination of bacterial concentration

Bacterial concentration in culture broth was estimated by measuring the absorbance at 600 nm (OD_{600}) and compared with standard curves. These curves were previously obtained for each bacterial genus by correlating colony forming units (CFU) ml^{-1} from plate counts and absorbance measurements over a range of bacterial concentrations.

Removal of toxins from MRS medium

Bacterial strains were screened for their ability to bind and/or degrade three *Fusarium* toxins. For each strain, two Erlenmeyer flasks containing 200 ml of medium were inoculated with 0·1 ml of an overnight culture, and were incubated at optimal temperature of growth (30 or 37°C) for 24 h. *Propionibacteria* strains were incubated at 30°C for 72 h. At the end of incubation, cultures were centrifuged (3000 ***g***, 10 min, 5°C), and supernatants were removed.

Toxin solutions containing DON (10 μg ml^{-1}) or FB_1 and FB_2 (10 μg ml^{-1} each) were prepared by evaporating solvents at 45°C with nitrogen gas, redissolving in water (5% v/v in the final solution) and adding MRS broth acidified to pH 4 with lactic acid.

For each strain, the bacterial pellet from 200-ml culture was resuspended in 2 ml of MRS-containing mycotoxin. Positive controls containing no bacteria and a negative control for each genus of LAB and PAB, containing no toxin were included. The mixtures were incubated in polypropylene tubes (1 ml per tube) at 30°C for 1 h with shaking (480 rev min^{-1}) and for 23 h without shaking. At the end of the incubation period, tubes were centrifuged (3000 ***g***, 10 min, 5°C), and the supernatants were directly analysed for toxins by reversed-phase HPLC. Assays and positive controls were performed in duplicate.

© 2006 The Authors

Effect of pH and heat treatment of bacteria on toxin removal

Three strains, selected for their high removal rate, were used in further experiments. They were LGG, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* R0149 (LDB) and *Leuconostoc mesenteroides* R1107 (LM). Bacterial cells were heat inactivated to determine if toxin removal was caused as a result of binding or biotransformation. In addition to pH 4, binding was also investigated at pH 6, 7·4 and 7·8. For these experiments, DON, NIV, ZEN, FB_1 and FB_2 were tested.

Bacteria were cultured in MRS broth at 37°C (LGG and LDB) or 30°C (LM) for 24 h and bacterial concentrations were estimated by OD_{600}. Cultures were washed three times by centrifugation (3000 ***g***, 10 min, 5°C) with phosphate-buffered saline (PBS 0·01 mol l^{-1}, pH 7·4). To prepare nonviable bacteria, aliquots of LDB and LM suspended in PBS were heat inactivated in a boiling water bath for 1 h. Toxin solutions of DON (5 μg ml^{-1}), DON + NIV (5 μg ml^{-1} each), ZEN (2 μg ml^{-1}), FB_1 + FB_2 (2·5 μg ml^{-1} each) in 0·1 mol l^{-1} citrate-phosphate buffer at pH 4, 6, 7·4 or 7·8 were prepared by evaporating solvents with nitrogen gas, redissolving in water (DON, NIV, FB_1, FB_2) or ethanol (ZEN) and adding the appropriate buffer to reach the desired concentration. The water or ethanol solvent represented 5% (v/v) of the final toxin solution.

For each pH, pellets of viable bacteria of each strain were suspended in 1 ml of toxin-buffered solution. Pellets of nonviable LDB and LM were suspended in 1 ml of toxin-buffered solution at pH 4. Final concentration of bacteria was 10^{10} CFU ml^{-1}. The mixtures were incubated at 37°C for 1 h with shaking (480 rev min^{-1}). At the end of the incubation period, tubes were centrifuged (3000 ***g***, 10 min, 5°C) and supernatants were analysed for toxins by reversed-phase HPLC. Positive controls containing no bacteria and a negative control containing no toxins were included for each treatment. Assays and positive controls were performed in triplicate.

Effect of bacterial concentration on toxin binding in acidified corn infusion

To check the binding properties of bacteria in conditions more similar to those of silage, the binding of ZEN and the mixture of fumonisins by LGG, LDB and LM were examined at various bacterial concentrations in acidified corn infusion. DON and NIV which were poorly bound by these bacteria in the previous experiment, were not used.

The corn infusion was prepared by steeping dried corn in water (6% w/v) at 60°C for 2 h. The infusion was filtered through a filter paper (Durieux, no. 120; VWR, Fontenay-sous-Bois, France), the filtrate was centrifuged (8500 ***g***, 5 min), and the supernatant was filtered through a 0·45-μm membrane. The infusion was adjusted to pH 4 with lactic acid before using.

Bacterial concentrations used were 10^7, 10^8, 10^9 and 10^{10} CFU ml^{-1} and toxin concentration was 10 μg ml^{-1}. Bacteria were washed as earlier, and binding assays were carried out in triplicate in the same conditions as in MRS medium.

Mycotoxin analysis

Separation and quantification of mycotoxins were performed at room temperature by HPLC using ultraviolet (UV) detection for DON and NIV, and fluorometry for ZEN and fumonisins. The HPLC system consisted of a P1000XR pump (SpectraSYSTEM, San Jose, California, USA) and an automatic sampler (SpectraPhysics, San Jose, California, USA). Separation was performed on C18 reversed-phase columns (Macherey-Nagel, France). The mobile phase used to separate DON and NIV consisted of a water–acetonitrile solution (92 : 8 v/v) and the flow rate was 1 ml min^{-1}. Detection was set at 230 nm and the retention times were 3·5 and 7·2 min for NIV and DON, respectively. The mobile phase used to separate ZEN consisted of a water–methanol solution (40 : 60 v/v) and the flow rate was 1·2 ml min^{-1}. The detection was set at 274-nm excitation and 440-nm emission. The retention time varied between 3·0 and 7·6 min depending on the pH. For FB_1 and FB_2, a gradient system was used with a mixture of 0·05 mol l^{-1} of dihydrogenphosphate–methanol (1 : 1 v/v) acidified at pH 3·35 with pure phosphoric acid and acetonitrile. Fumonisins were derivatized before injection using *ortho*-phtalaldehyde (OPA) plus mercaptoethanol. Ten microlitre of sample was mixed with 90 μl of 0·1-mol l^{-1} borate buffer at pH 10, followed by the addition of 100 μl of derivatizing reagent. The preparation was mixed and allowed to react for 2 min before injection. The flow rate was 1 ml min^{-1}, and detection was set at 336-nm excitation and 440-nm emission. The retention times were 8·5 and 9·8 min for FB_1 and FB_2, respectively.

The percentage of toxin removed was calculated by using the following formula:

$$\text{Toxin removed (\%)} = 100 \times \frac{(1 - \text{Peak area of toxin in the supernatant})}{\text{Peak area of toxin in the positive control}}$$

Statistical analysis

Data were subjected to the analysis of variance (ANOVA). A significant difference ($P < 0{\cdot}05$) between means was

© 2006 The Authors

determined by Duncan's multiple-range test using the Statistical Analysis System software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Removal of toxins from MRS medium

Most strains tested were able to remove DON and fumonisins from the acidified culture medium (Table 1). Up to 55% DON, 82% FB_1 and 100% FB_2 were removed at the bacterial concentrations used in the screening test that ranged from 1×10^9 to $2{\cdot}1 \times 10^{11}$ CFU ml^{-1}. None of the most common degradation products for each toxin, aminopentols for FB_1 and FB_2, and DOM for DON, were detected in the incubation medium or bound to cells. An example of typical HPLC chromatograms of supernatants from the medium containing fumonisins incubated with and without bacteria is shown in Fig. 1. *Propionibacteria* were the less efficient at removing DON from the medium. For other bacterial species, removal of DON differed among strains. At similar bacterial concentrations, *Lact. rhamnosus* strains GG and R0011 removed DON with an efficiency of 54% and 30%, respectively. Similarly, *L. lactis* strain CS43 removed 23% of DON, while strain CS202 removed up to 40% of DON. In contrast, the removal of fumonisins was less variable among strains of the same species. For instance, the fractions of FB_1 and FB_2 removed by the four *Lact. plantarum* strains tested were almost identical at similar bacterial concentrations.

Table 1 Removal of deoxynivalenol and fumonisins in culture medium by viable fermentative bacteria*

		Deoxynivalenol		Fumonisins (FB)		
Taxon	Culture collection no.	Bacterial concentration ($\times 10^{10}$ CFU ml^{-1})	Fraction removed (%)	Bacterial concentration ($\times 10^{10}$ CFU ml^{-1})	Fraction FB_1 removed (%)	Fraction FB_2 removed (%)
Lactic acid bacteria						
Lactobacillus rhamnosus GG	ATCC 53103	4·0	54 ± 3	4·0	74 ± 1	94 ± 0
Lact. rhamnosus	R0011	4·1	30 ± 4	3·8	67 ± 0	87 ± 0
Lact. rhamnosus	R1039	3·4	40 ± 4	3·5	61 ± 1	92 ± 0
Lactobacillus plantarum	R1012	4·6	20 ± 0	5·3	74 ± 2	91 ± 0
Lact. plantarum	R1027	4·1	23 ± 0	4·0	74 ± 1	92 ± 1
Lact. plantarum	R1051	4·3	13 ± 1	4·8	72 ± 2	97 ± 0
Lact. plantarum	R1096	4·9	19 ± 2	4·9	74 ± 1	97 ± 0
Lactobacillus.brevis	R0002	2·8	32 ± 1	2·9	ND	82 ± 3
Lactobacillus acidophilus	R0052	4·4	34 ± 1	4·7	54 ± 3	78 ± 1
Lactobacillus delbruekii ssp. *bulgaricus*	R0149	3·2	55 ± 1	2·2	72 ± 1	95 ± 0
Lactobacillus reuteri	R0365	4·3	22 ± 3	3·8	35 ± 2	81 ± 1
Lactobacillus buchneri	R1102	0·5	19 ± 1	0·5	ND	57 ± 5
Lactobacillus helveticus	46	0·5	ND	1·7	51 ± 1	92 ± 0
Lactobacillus jugurti	63	0·3	19 ± 0	0·1	14 ± 3	32 ± 4
Lactobacillus helveticus	72	1·1	21 ± 1	1·6	51 ± 7	81 ± 1
Lactobacillus lactis	170	2·6	27 ± 3	1·1	52 ± 2	81 ± 2
Lactobacillus casei ssp. *casei*	C3	2·7	36 ± 1	2·7	65 ± 1	90 ± 2
Pediococcus acidilactici	R1001	4·8	ND	4·7	57 ± 2	87 ± 0
Pediococcus pentosaceus	R1044	4·6	ND	4·7	79 ± 1	92 ± 0
Streptococcus thermophilus	R1018	0·7	31 ± 3	0·6	ND	91 ± 0
Strep. thermophilus	NG40Z	0·4	22 ± 3	0·4	ND	83 ± 2
Strep. thermophilus	B5	0·7	37 ± 0	0·7	ND	95 ± 0
Lactococcus lactis	CS 43	12·3	23 ± 1	13·0	ND	100 ± 0
L. lactis	CS 202	12·0	40 ± 5	11·6	ND	100 ± 0
L. lactis	CS 197	13·5	23 ± 1	12·7	ND	100 ± 0
Leuconostoc mesenteroides	R1107	4·6	46 ± 1	5·2	82 ± 0	96 ± 0
Propionic acid bacteria						
Propionibacterium	R0408	9·6	18 ± 2	21·5	ND	74 ± 0
Propionibacterium	R0410	21·4	10 ± 3	21·7	ND	76 ± 0
Propionibacterium	R0501	14·3	11 ± 2	20·2	ND	61 ± 1

*Bacteria from 100× concentrated cultures were incubated in De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth acidified at pH 4 at 30°C for 1 h with shaking (480 rev min^{-1}) and for 23 h without shaking. Toxin concentration was 10 μg ml^{-1}. Data shown are the mean ± SD of duplicates. ND, no data, toxin co-eluted with culture metabolite(s) for these strains.

© 2006 The Authors

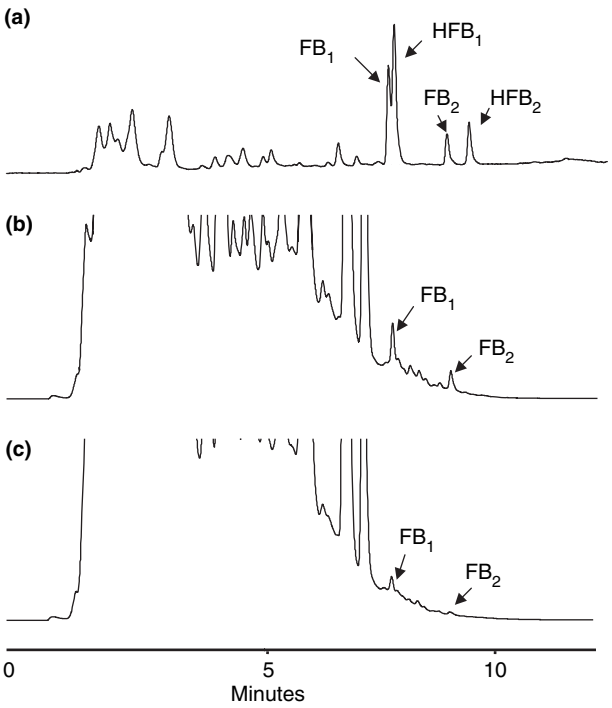


Figure 1 HPLC chromatograms of a mixture of fumonisins B_1 (FB_1) and B_2 (FB_2) and aminopentols (HFB_1 and HFB_2) (a), supernatants from acidified De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) broth containing FB_1 and FB_2 (10 μg ml^{-1} each) incubated at 30°C for 24 h without bacteria (b), and with *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (c). The fractions of fumonisins decreased after incubation with bacteria and aminopentols were not detected.

Three strains, LGG, LDB and *Leuc. mesenteroides*, were further used to determine the type of detoxification and the effects of pH and bacterial concentration on the removal of *Fusarium* toxins.

Effect of pH on toxin removal

The three strains tested, removed ZEN and FB_2 more efficiently (up to 88% and 82%, respectively) than DON, NIV and FB_1 (up to 19%, 25% and 31%, respectively) (Table 2). The removal of fumonisins was highest at pH 4 and decreased drastically at higher pH values ($P < 0{\cdot}05$). For ZEN, toxin removal was also influenced by pH for LGG and LDB ($P < 0{\cdot}05$), but these differences were not as marked as that for the fumonisins. In contrast, removal of DON and NIV was not influenced by pH ($P > 0{\cdot}05$). The proportion of DON removed, alone or in association with NIV, was similar for all three strains.

Effect of bacterial viability on toxin removal

Removal of toxins by LDB and LM was not negatively affected by heat treatment (Fig. 2). Nonviable LDB and LM removed more ZEN (89% and 85%, respectively) than viable cells (75% and 67%, respectively) ($P < 0{\cdot}05$). Fumonisin removal was also higher for nonviable cells ($P < 0{\cdot}05$). In contrast, the removal of DON and NIV were not different between viable and nonviable bacteria.

Effect of bacterial concentration

Removal of toxins in acidified corn infusion increased with increased bacterial concentration (Fig. 3). ZEN removal, which was similar in all three strains used, increased from about 20% at 10^8 CFU ml^{-1} to more than 75% at concentrations of 10^{10} CFU ml^{-1}. However, there were differences among strains for fumonisins. LDB was more efficient than LGG and LM at low cell concentra-

Table 2 Effect of pH on the removal of *Fusarium* toxins by *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* and *Leuconostoc mesenteroides**

	Fraction removed (%)											
	Lact. rhamnosus GG				*Lact. delbruekii* ssp. *bulgaricus*				*Leuc. mesenteroides*			
Toxin†	pH 4	pH 6	pH 7·4	pH 7·8	pH 4	pH 6	pH 7·4	pH 7·8	pH 4	pH 6	pH 7·4	pH 7·8
ZEN	69 ± 1^{ab}	61 ± 6^{b}	73 ± 2^{a}	75 ± 1^{a}	75 ± 1^{c}	75 ± 1^{c}	88 ± 2^{a}	79 ± 1^{b}	67 ± 1	68 ± 0	65 ± 1	64 ± 1
DON	13 ± 2	16 ± 4	11 ± 4	9 ± 0	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	13 ± 1	5 ± 5	9 ± 2	8 ± 2	6 ± 3
DON + NIV												
DON	19 ± 2	13 ± 3	13 ± 1	10 ± 9	12 ± 1	14 ± 1	15 ± 2	17 ± 5	9 ± 2	6 ± 1	8 ± 1	6 ± 2
NIV	13 ± 1	13 ± 3	20 ± 0	16 ± 7	12 ± 3	14 ± 1	19 ± 3	13 ± 3	5 ± 3	6 ± 3	6 ± 1	6 ± 3
FB_1 + FB_2												
FB_1	24 ± 5^{a}	18 ± 4^{ab}	10 ± 6^{bc}	0 ± 0^{c}	31 ± 6^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	16 ± 13	0 ± 0	1 ± 4	0 ± 0
FB_2	72 ± 5^{a}	36 ± 6^{b}	10 ± 8^{c}	4 ± 3^{c}	82 ± 1^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	4 ± 3^{b}	55 ± 9^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	4 ± 3^{b}

Data shown are the mean ± SD of triplicates. Within a row, means followed by different letters are significantly different ($P < 0{\cdot}05$).
*Bacteria, 10^{10} CFU ml^{-1}, were incubated in the presence of toxins for 1 h at 37°C.
†Zearalenone (ZEN, 2 μg ml^{-1}), deoxynivalenol (DON, 5 μg ml^{-1}), deoxynivalenol + nivalenol (DON + NIV, 5 μg ml^{-1} each) and fumonisin B_1 + fumonisin B_2 (FB_1 + FB_2, 2·5 μg ml^{-1} each).

© 2006 The Authors

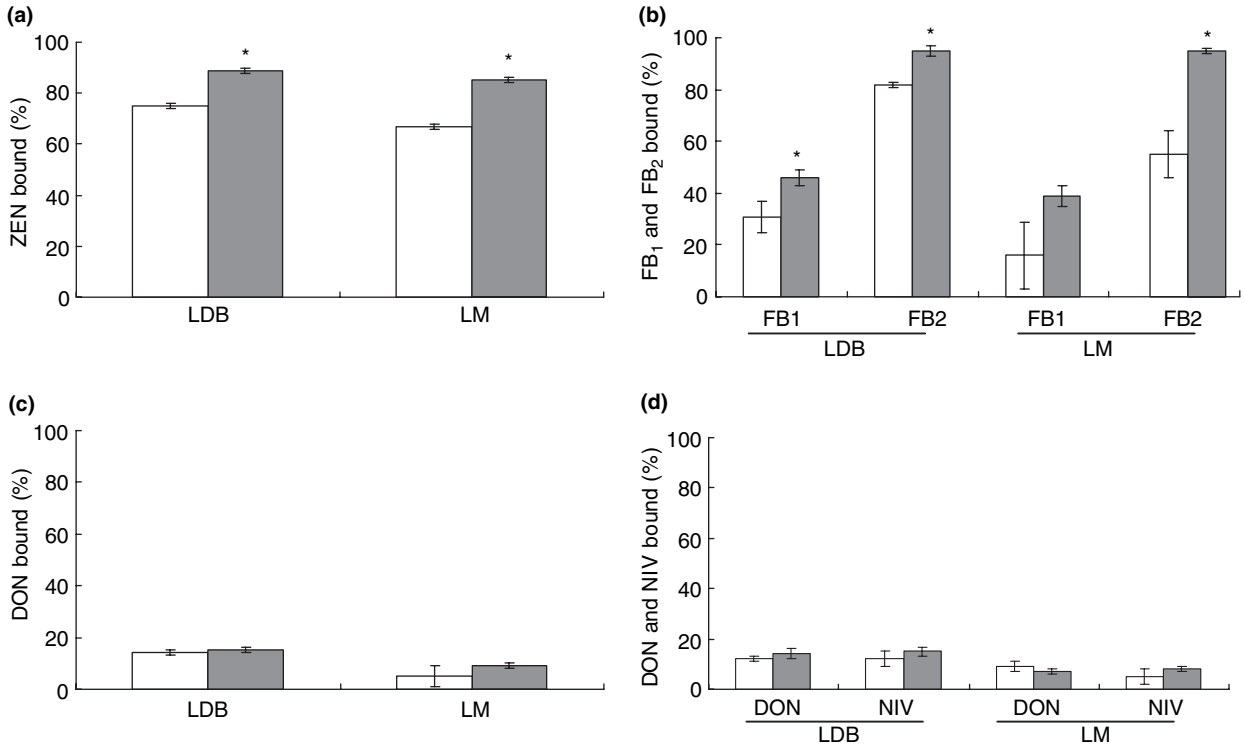


Figure 2 Effect of viable and nonviable bacteria on the removal of zearalenone (ZEN, 2 μg ml^{-1}) (a), fumonisin B_1 + fumonisin B_2 (FB_1 + FB_2, 2·5 μg ml^{-1} each) (b), deoxynivalenol (DON, 5 μg ml^{-1}) (c), deoxynivalenol + nivalenol (DON + NIV, 5 μg ml^{-1} each) (d) by 10^{10} CFU ml^{-1} viable (white bars) and heat-inactivated (grey bars) *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* R0149 (LDB) and *Leuconostoc mesenteroides* R1107 (LM) incubated for 1 h at 37°C, pH 4. Data shown are the means of triplicates and error bars represent standard deviations. (*) indicates difference between viable and nonviable bacteria (P < 0·05).

tions. At densities of 10^8 CFU ml^{-1}, LDB removed 16% and 36% of FB_1 and FB_2, respectively, as compared with less than 5% and 15% removal for LGG and LM cells.

Discussion

Removal of *Fusarium* toxins was widespread among fermentative bacteria used in this work, and their utilization to decrease the impact of mycotoxins present in silages could be a viable alternative to physical and chemical methods currently available for detoxification. The ability of LGG to bind mycotoxins, particularly AFB_1, has been reported in several studies (El-Nezami *et al.* 1998; Haskard *et al.* 2000; Byun and Yoon 2003). This bacterium was used as a reference in this study. In this study, we focussed on the removal of *Fusarium* toxins using an experimental model that simulated the acidic conditions of silages. The model allowed to detect binding and/or biodegradation of the toxins tested. In addition, it was the first time, in which the removal of fumonisins by fermentative bacteria was assayed.

The six genera of LAB and PAB used in this study were able to remove DON and fumonisins from the acidified MRS medium. Other *Fusarium* toxins, NIV and ZEN, were also removed by selected strains. The percentage of toxin removed depended strongly on the bacterial concentration. This relationship was not linear, as exemplified in Fig. 3 for some toxins, and high densities were generally needed for a significant removal. The differences observed for LGG, LDB and LM between the results shown in Table 1 and those of subsequent experiments (Table 2, Figs 2 and 3) could be explained by the dissimilar bacterial concentrations used. Nevertheless, some strains were able to remove significant amount of toxins at densities as low as 10^8 CFU ml^{-1}, a concentration of fermentative bacteria that is normally attained in silages (Weinberg *et al.* 2004).

Binding seemed to be the main mechanism involved in the toxins' removal because: (i) no differences were observed between incubation of viable and nonviable bacteria (Fig. 2) and (ii) no toxin degradation products were observed on the HPLC chromatograms. This result is in agreement with previous studies that indicate binding at the bacterial cell wall as the mechanism of removal of mycotoxins by LAB (Haskard *et al.* 2000; El-Nezami *et al.* 2002a,b). For ZEN and fumonisins, the amount of toxin

© 2006 The Authors

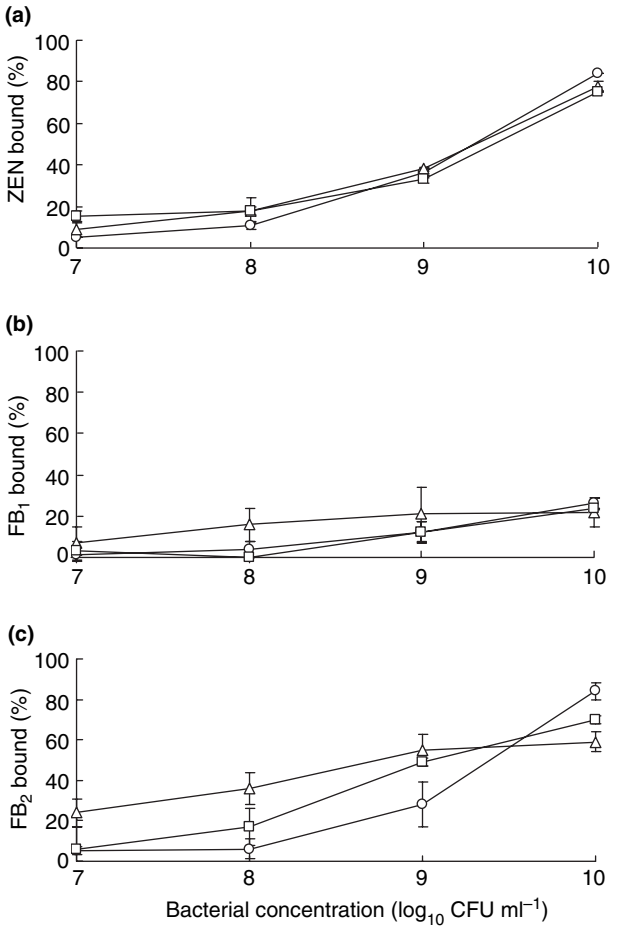


Figure 3 Effect of the bacterial concentration on the removal of zearalenone (ZEN) (a), fumonisin B_1 (FB_1) (b) and fumonisin B_2 (FB_2) (c), by viable *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 (○), *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* R0149 (△) and *Leuconostoc mesenteroides* R1107 (□) incubated for 24 h at 25°C in corn infusion acidified at pH 4. Toxin concentration was 10 μg ml^{-1}. Data shown are means of triplicates and error bars represent standard deviations.

bound by nonviable bacteria was higher than that for viable bacteria, suggesting that changes in the cell-wall conformation, induced by the heat-inactivation treatment, modified favourably and/or increased the availability of binding sites.

Fumonisins, like the heterocyclic amines (Trp-P1, IQ), have a free amine group. By acetylation of these compounds (substitution of the function amine), Rajendran and Ohta (1998) showed that binding to the cell wall of LAB was greatly inhibited, suggesting that the amine group plays an important role in heterocyclic amines' binding. It is possible that the same mechanism may occur with the fumonisins. The variability between the bound fractions of FB_1 and FB_2 suggest that the additional hydroxyl group of the FB_1 plays a negative role on binding. A less favourable spatial conformation by the formation of hydrogen bonds between this extra hydroxyl group and a carboxyl group may limit the accessibility of FB_1 to the binding sites.

No marked effect of pH on ZEN binding by viable LGG, LDB and LM was observed. This result is similar to that of El-Nezami *et al.* (2004) for LGG, and suggests that ZEN is not bound to these bacteria by hydrogen bonds. The binding of DON and NIV was also independent of pH. The percentage of DON bound by bacteria was similar when the toxin was incubated alone or in association with NIV, suggesting that binding sites were not the same or that shared binding sites were not saturated at the concentration of toxins used. The variability in DON binding by the strains tested (Table 1) is probably due to structural differences in the bacterial cell wall.

Once the complex toxin-bacterium is formed, it is stable to washing and changes in pH. The complexes formed by FB_1, FB_2 and ZEN with LGG at pH 4 were exposed to successive incubations at pH 6, 3 and 7·5 for 6, 1 and 3 h, respectively. The amount of toxin released after each incubation was then taken out and measured. The percentage of bound toxin at the end of the treatment was 95% and 85% for both fumonisins and ZEN, respectively (data not shown). The incubation times, pH and temperature (39°C) were chosen to mimic the conditions found in the gastrointestinal tract of ruminants. Although, this is not a true gastrointestinal model, these exploratory results indicate that the complex may resist the variations in pH encountered throughout the passage in the digestive tube.

It is interesting to note that the level of binding was generally maximal at the pH of well-conserved silage. In lower quality silages with pH higher than 4, binding of ZEN, DON and NIV would be similar, while that of fumonisins would be greatly reduced.

This study is a first approach to examine the ability of fermentative bacteria to reduce *Fusarium* toxins present in silages. The bacteria tested efficiently bound ZEN and fumonisins, and to a lesser extent, DON and NIV. Further studies are needed to select bacterial strains or combinations of strains that efficiently remove toxins at cell densities naturally present in silage. The stability of the bacteria–mycotoxin complex in the gastro-intestinal tract is also essential for the practical application of this technology.

Acknowledgements

V. Niderkorn is the recipient of a CIFRE Lallemand SAS research fellowship. The authors are thankful to the Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA Thivernal-Grignon, France; the Research

© 2006 The Authors

Laboratory for Animal Husbandry, INRA Corte, France; and Lallemand SAS, Blagnac, France, for providing the strains of LAB and PAB. The authors also thank Henri Durand and Frederique Chaucheyras-Durand for their scientific assistance in this project.

References

Boudra, H., Morgavi, D.P., Galtier, P. and Michalet-Doreau, B. (2002) Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in conserved forage: significance and prevention. *9emes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*. Paris, France, 4–5 Decembre 2002.

Byun, J.R. and Yoon, Y.H. (2003) Binding of aflatoxin G1, G2 and B2 by probiotic *Lactobacillus* spp. *Asian Australas J Anim Sci* **16**, 1686–1689.

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M. and Macdonald, A.M.C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim Feed Sci Technol* **80**, 183–205.

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol* **36**, 321–326.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002a) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3545–3549.

El-Nezami, H., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002b) Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and Propionibacterium. *Food Addit Contam* **19**, 680–686.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2004) Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *J Agric Food Chem* **52**, 4577–4581.

Eriksen, G.S. and Pettersson, H. (2004) Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim Feed Sci Technol* **114**, 205–239.

Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G. (1991) Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis* **12**, 1247–1251.

Haskard, C., Binnion, C. and Ahokas, J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem Biol Interact* **128**, 39–49.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. and Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett* **122**, 179–188.

Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. and Ahokas, J.T. (2004) Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit Contam* **21**, 158–164.

Malik, A.C., Reinbold, G.W. and Vedamuthu, E.R. (1968) An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. *Can J Microbiol* **14**, 1185–1191.

Mills, J.T. (1989) Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J Food Prot* **52**, 737–742.

Morotomi, M. and Mutai, M. (1986) *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* **77**, 195–201.

Pagliuca, G., Zironi, E., Ceccolini, A., Matera, R., Serrazanetti, G.P. and Piva, A. (2005) Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B-1 and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr B* **819**, 97–103.

Rajendran, R. and Ohta, Y. (1998) Binding of heterocyclic amines by lactic acid bacteria from miso, a fermented Japanese food. *Can J Microbiol* **44**, 109–115.

Scudamore, K.A. and Livesey, C.T. (1998) Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J Sci Food Agric* **77**, 1–17.

Seeling, K. and Danicke, S. (2005) Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition. A review. *J Anim Feed Sci* **14**, 3–40.

Sreekumar, O. and Hosono, A. (1998) The heterocyclic amine binding receptors of *Lactobacillus gasseri* cells. *Mutat Res* **421**, 65–72.

Thyagaraja, N. and Hosono, A. (1994) Binding properties of lactic acid bacteria from idly towards food-borne mutagens. *Food Chem Toxicol* **32**, 805–809.

Trenholm, H.L., Charmley, L.L., Prelusky, D.B. and Warner, R.M. (1992) Washing procedures using water or sodium-carbonate solutions for the decontamination of 3 cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J Agric Food Chem* **40**, 2147–2151.

Weinberg, Z.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., Chen, Y. and Gamburg, M. (2004) Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 1–9.

Young, J.C., Subryan, L.M., Potts, D., McLaren, M.E. and Gobran, F.H. (1986) Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. *J Agric Food Chem* **34**, 461–467.

Zhang, X.B. and Ohta, Y. (1991) Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *J Dairy Sci* **74**, 1477–1481.

© 2006 The Authors

Milieu d'incubation **: infusât de maïs acidifié à pH 4 avec de l'acide lactique**

- Le choix de ce milieu permet de s'approcher des conditions d'un ensilage de maïs en terme de substrat et d'acidité.
- Cette valeur de pH (ensilage bien conservé) est d'autant plus intéressante que les fumonisines sont séquestrées plus efficacement en milieu acide qu'en milieu neutre ou alcalin, et qu'un pH bas n'affecte pas la séquestration du DON et de la ZEN.

Nature et concentration des fusariotoxines testées: **DON, ZEN et mélange FB_1 - FB_2, 5 µg/ml**

- Les fusariotoxines majeures (DON, ZEN, fumonisines) sont testées tout en limitant le nombre de toxines au minimum afin de pouvoir cribler un plus grand nombre de souches.
- L'association des fumonisines B_1 et B_2 est généralement observée dans les végétaux contaminés.
- La concentration choisie (5 µg/ml) est la même pour toutes les fusariotoxines testées. Cette homogénéité permet, pour une même souche, de comparer le niveau d'élimination de chacune d'elles. La valeur de concentration choisie correspond à une limite haute de contamination naturelle et, par conséquent, permet d'évaluer la capacité des souches bactériennes à éliminer les toxines présentes dans des ensilages fortement contaminés.

Concentration et stade de croissance des bactéries ***:*** **5×10^8 UFC/ml**

- La concentration bactérienne de 5×10^8 UFC/ml permet de mesurer des taux d'élimination de fusariotoxines significatifs et de manière suffisamment discriminante pour observer des différences entre souches. L'utilisation d'une même concentration bactérienne pour toutes les souches testées permet de comparer leur potentiel de détoxification.
- Cette concentration bactérienne est représentative de celle généralement rencontrée dans les ensilages (10^8 – 10^9 UFC/ml) (Weinberg *et al.* 2004).
- A concentration bactérienne égale, les fractions de ZEN, FB_1 et FB_2 séquestrées sont peu différentes selon le stade de croissance (**figure 5**). Afin d'utiliser un stade de croissance équivalent pour toutes les souches et pour permettre d'obtenir une croissance suffisante des souches à pousse plus lente comme les *Streptococci*, une durée d'incubation de 24h a été retenue pour toutes les cultures.

Paramètres d'incubation des bactéries avec les fusariotoxines

La température d'incubation de 25°C permet de s'approcher des conditions extérieures et la durée d'incubation (24 h) doit permettre de visualiser une éventuelle biotransformation.

Encadré 1. Choix des paramètres du test *in vitro* utilisé pour le criblage de souches de bactéries fermentaires

2. Criblage de souches de bactéries fermentaires

Selon les résultats du pré-criblage, la capacité à séquestrer les fusariotoxines semble répandue chez les bactéries fermentaires à des niveaux variables. Le criblage d'un grand nombre de souches va nous permettre d'appréhender des différences entre genres, espèces ou souches, susceptibles de mettre à jour des caractéristiques physiologiques favorables au phénomène de séquestration.

La biotransformation des mycotoxines, et *a fortiori* des fusariotoxines, n'ayant jamais été décrite chez des souches pures de bactéries lactiques ou propioniques, la probabilité de déceler de telles souches pourrait augmenter avec le nombre et la diversité des souches testées. Le test utilisé permet en particulier de déceler une biotransformation i) du DON en DOM, ii) de la ZEN en α et β zéaralénols (α et β ZOL), α et β zéaralanol (α et β ZAL) ou zéaralanone (ZAN), iii) de la FB_1 et de la FB_2 en aminopentols (AP_1 ou AP_2).

L'objectif principal du criblage est de sélectionner une ou plusieurs souches particulièrement actives pour biotransformer et/ou séquestrer le DON, la ZEN et les fumonisines.

2.1 Choix des valeurs des paramètres du test *in vitro*

Les valeurs des paramètres du test *in vitro* retenues pour ce criblage de souches, ainsi que la justification des choix réalisés, sont indiquées dans l'**encadré 1**.

2.2 Choix des souches

Une totalité de 202 souches appartenant à sept genres de bactéries fermentaires et issues de six collections ont été testées (**annexe 9**). Parmi ces souches, 137 appartiennent au genre *Lactobacillus* dont 46 *Lb. plantarum* d'origine végétale (collection CNRS – FRE2326). Ce genre est fortement représenté car il est présent en proportion importante dans la microflore fermentaire des ensilages (Langston et Bouma 1960) et entre fréquemment dans la composition des conservateurs biologiques d'ensilage (Weinberg et Muck 1996a). L'espèce *Lb. plantarum* semble être l'espèce prédominante (Nilsson et Nilsson 1956; Gibson *et al.* 1958). Les autres genres testés (*Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Propionibacterium*) font également tous partie de la microflore fermentaire

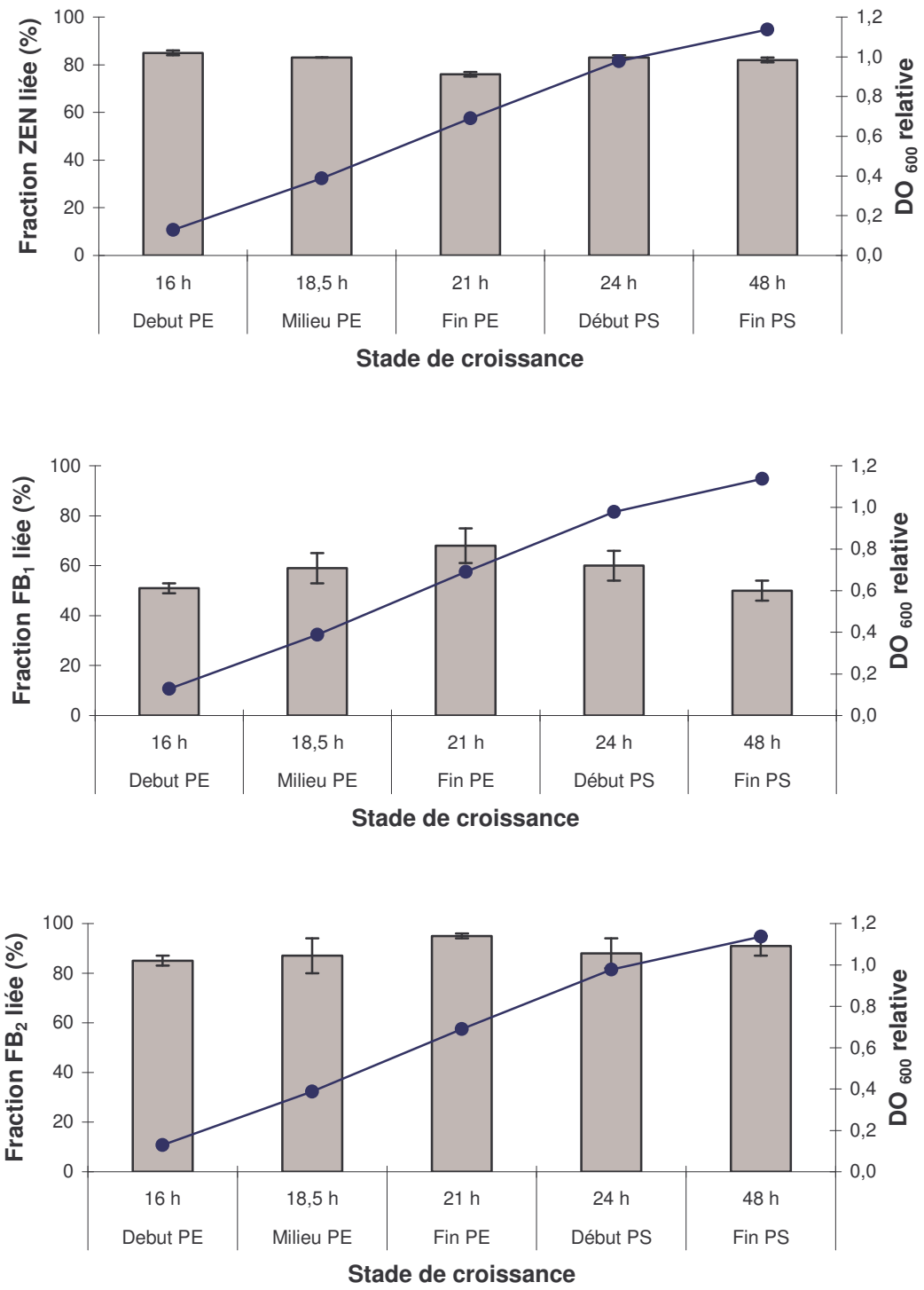


Figure 5 : Effet du stade de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) sur le taux de séquestration de la zéaralénone (ZEN) et des fumonisines B_1 et B_2. Les bactéries (concentration bactérienne constante = 10^{10} UFC/ml) ont été incubées à chaque stade (PE = phase exponentielle, PS = phase stationnaire) dans du tampon pH 4 contenant de la ZEN (2 µg /ml) ou un mélange de FB_1 et FB_2 (2,5 µg/ml chacune) pendant 1h à 37°C. La courbe correspond à la croissance de la souche exprimée en UDO_{600}. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des fractions de fusariotoxines liées. Les essais ont été réalisés en triple.

des ensilages à des degrés divers selon le substrat et le stade de conservation (Moon *et al.* 1981; Ruser 1989).

2.3 Protocole expérimental

Criblage de bactéries fermentaires pour leur capacité à séquestrer et/ou biotransformer les fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 en infusât de maïs acidifié (**annexe 8**).

2.4 Article - Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage

Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage

V. Niderkorn[1,3], D.P. Morgavi[1], E. Pujos[2], A. Tissandier[1], & H. Boudra[1]

[1] INRA, Herbivore Research Unit, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France
[2] INRA, Research Unit for Protein-Energy Metabolism, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France
[3]Lallemand S.A.S, 19, rue des briquetiers, B.P. 59, F-31702 Blagnac, France

Running headline: *Fusarium* toxins removal by fermentative bacteria
Keywords: *Fusarium*, mycotoxins, fermentative bacteria, probiotic, binding, biotransformation, corn silage

ABSTRACT

Fermentative bacteria can potentially be utilized to detoxify corn silages contaminated by *Fusarium* toxins. The objective of the present study was to test a large number of these bacteria for their ability to bind and/or biotransform deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), and fumonisins B_1 and B_2 (FB_1, FB_2) in conditions simulating corn silage. A total of 202 strains were screened in contaminated, pH 4, corn infusion inoculated with 5×10^8 CFU ml^{-1}. Eight *Lactobacilli* and three *Leuconostoc* biotransformed ZEN into α zearalenol, but no biotransformation was detected for DON and fumonisins. In contrast, most strains were capable to bind *Fusarium* toxins. The most effective genera were *Streptococcus* and *Enterococcus* capable to bind up to 33%, 49%, 24% and 62% of DON, ZEN, FB_1 and FB_2, respectively. The ability to bind *Fusarium* toxins seems to be a common property of fermentative bacteria and could contribute to decrease their toxicity in animals.

Introduction

Whole-plant corn silage and high moisture, fermented corn grain are widely utilized as ruminants and swine feeds, respectively. Under unfavourable climatic conditions, *Fusarium* toxins including deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN), and fumonisins (FB) can be produced on corn plants in the field (Lepom *et al.* 1990) and be present in silage (Scudamore and Livesey 1998; Orsi *et al.* 2000). Ingestion of mycotoxin-contaminated corn by animals affects performances and health. Among farm animals, swine appear to be most susceptible to the toxic effects of *Fusarium* toxins, especially to ZEN (Diekman and Green 1992). Although ruminants are considered more resistant, the risk should not be underestimated as data of toxicity after chronic exposure or due to interactions among mycotoxins are limited (Seeling and Danicke 2005). ZEN is associated with estrogenic syndrome and DON causes vomiting in pigs, as well as decreased feed intake and digestive disorders in both pigs and ruminants, leading to losses of weight gain (D'Mello *et al.* 1999; Eriksen and Pettersson 2004). Fumonisins cause pulmonary edema in swine (Harrison *et al.* 1990) and hepatotoxicity in ruminants (Diaz *et al.* 2000).

In spite of the progress made in preventive approaches such as breeding of resistant corn varieties (Mesterhazy 1989) and improvement in agronomic practices (Trenholm *et al.* 1989) to decrease *Fusarium* contamination, hazardous concentrations of *Fusarium* toxins may occur in corn justifying the use of detoxification methods. Physical and chemical methods such as ammonia treatment or the addition of adsorbents (Scott 1998; Huwig *et al.* 2001) are generally expensive, drastic, not specific, or simply not adapted to the treatment of corn destined to livestock. Inorganic adsorbents, although they have a high affinity to bind aflatoxins, are not efficient for *Fusarium* toxins. In addition, these agents can also bind important micronutrients like minerals or vitamins (Guerre 2000). Practical methods for the detoxification of silage are currently not available. A promising approach is the use of selected microorganisms to remove *Fusarium* toxins (Bata and Lasztity 1999). Detoxification can be achieved by microbial binding and/or biotransformation of mycotoxins into less toxic compounds (Styriak and Conkova 2002). Due to their role in the ensiling process, fermentative bacteria are appropriate candidates for the biological detoxification of corn silage. The bioconversion of *Fusarium* toxins by rumen microbes and intestinal microflora was reported (Kiessling *et al.* 1984; Kollarczik *et al.* 1994; Caloni *et al.* 2000) but the bacteria responsible for their biotransformation were not identified. In contrast, binding of DON and ZEN to the cell wall of probiotic strains *in vitro* has been recently reported (El-Nezami *et al.* 2002a; 2002b). This property can decrease the bioavailability of these compounds by

reducing absorption and limit their toxic effects (El-Nezami *et al.* 1999). However, to date, only three strains were thoroughly investigated. In addition, they were effective at about 10^{10} CFU ml^{-1}, a high bacterial concentration that is difficult to obtain in fermented corn feeds.

In this study, a large number of strains of fermentative bacteria were screened for their ability to remove DON, ZEN, FB_1 and FB_2 from a medium that simulated silage in term of substrate, pH, and bacterial concentration. The test conditions chosen allowed to observe simultaneously binding and/or biotransformation.

Materials and methods

Bacterial strains

Bacterial strains were obtained from different collections (LGC Promochem, Molsheim, France; Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA, Thivernal-Grignon, France; Research Laboratory for Animal Husbandry, INRA, Corte, France; Lallemand SAS, Blagnac, France; Laboratory of Dynamics, Evolution and Expression of Genomes of Microorganisms, University Louis Pasteur/CNRS FRE 2326, Strasbourg, France; Cheese Research Laboratory, INRA, Aurillac, France). A total of 202 strains were tested: 137 *Lactobacilli*, 17 *Lactococci*, 6 *Leuconostoc*, 2 *Pediococci*, 5 *Propionibacteria*, 31 *Streptococci*, and 4 *Enterococci*. The majority of strains were isolated from dairy and plant material. For long-term conservation, all isolates were stored at -80°C in 30% glycerol.

Media

De Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS, Oxoïd Ltd, Basing-stoke, UK) was used for the culture of *Lactobacilli*, *Pediococci* and *Leuconostoc*. M17 broth (Oxoïd Ltd, Basing-stoke, UK) containing 5% v/v of a 10% w/v lactose solution was used for the culture of *Lactococci*, *Streptococci* and *Enterococci*. Yeast Extract Lactate (YEL) medium, prepared according to Malik and Vedamuthu (1968), was used for the culture of *Propionibacteria*.

A corn infusion was prepared by steeping dry whole-plant corn in water (6% w/v) at 60°C for 2 h. The infusion was then filtered through filter paper (Durieux, no. 120, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), the filtrate was centrifuged (8500 g, 5 min) and the decanted supernatant was filtered through a 0.45 µm membrane. The filtered infusion was stored at 4°C and adjusted to pH 4 with lactic acid before using.

Mycotoxins and derivatives

DON, FB_1, FB_2, ZEN and its main derivatives α and β zearalenols (α and β ZOL), α and β zearalanols (α and β ZAL), and zearalanone (ZAN) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie Gmbh (Steinheim, Germany). The most common derivative of DON, deepoxy-deoxynivalenol (DOM) was purchased from Biopure (Tulin, Austria). Derivatives of fumonisins, aminopentols (HFB_1 and HFB_2), were obtained by hydrolysis of FB_1 and FB_2 according to Pagliuca *et al.* (2005). DON and ZEN (and derivatives) were dissolved in acetonitrile and methanol, respectively. Concentration was determined by measuring the absorbance at 218 nm for DON (ε = 6406 $mmol^{-1}$ cm^2) and at 274 nm for ZEN (ε = 13 909 $mmol^{-1}$ cm^2). Since spectrophotometry is not possible with FB_1 and FB_2, these compounds were dissolved in an exact volume of acetonitrile-water 1:1(v/v) to achieve the desired concentration. Mycotoxin solutions of DON (5 µg ml^{-1}), ZEN (5 µg ml^{-1}), FB_1 + FB_2 (5 µg ml^{-1} each) in corn infusion were prepared by evaporating solvents with nitrogen gas, redissolving in water (DON, FB_1, FB_2) or ethanol (ZEN) and adding corn infusion to reach the desired concentration. The water or ethanol solvent represented 5% (v/v) of the final mycotoxin solution.

Mycotoxin removal test

Bacteria screened for their ability to bind and/or biotransform *Fusarium* toxins were prepared as follow. For each strain, one tube containing 20 ml of medium was inoculated with 0.1 ml of an overnight culture and was incubated at optimal temperature of growth (30 or 37°C) for 24 h. *Propionibacteria* strains were incubated at 30°C for 72 h. At the end of incubation, the bacterial concentration of cultures was estimated by measuring the absorbance at 600 nm as described previously (Niderkorn *et al.* 2006). A volume of culture containing 35 × 10^8 CFU was centrifuged (3000 g, 10 min, 5°C) and the supernatant was removed. The bacterial pellet was washed twice with 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4). After the second wash, the bacterial pellet was resuspended in 7 ml PBS to obtain a concentration of 5 × 10^8 CFU ml^{-1}, and transferred to six polypropylene tubes (1 ml per tube). Tubes were centrifuged (3000 g, 10 min, 5°C), supernatants were removed, and bacteria were resuspended in 1 ml of one of the three mycotoxin solutions. Positive controls containing no bacteria and a negative control per bacterial genus containing no mycotoxin were included. All the tubes were incubated at 25°C in microaerophilic conditions for 1 h with shaking (480 rpm), then for 23 h without shaking. At the end of the incubation period, tubes were centrifuged (3000 g, 10 min, 5°C) and supernatants were analysed for mycotoxins by reversed-phase HPLC. Assays and positive controls were performed in duplicate.

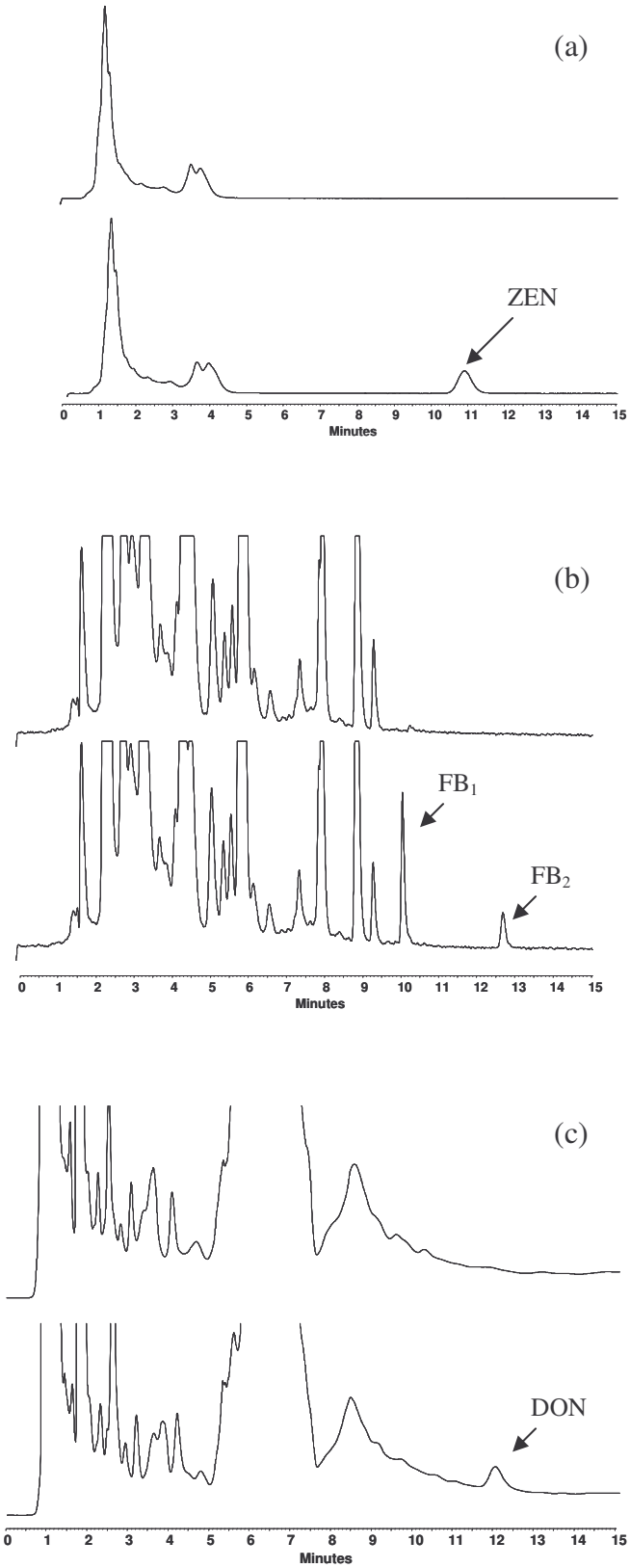


Figure 1. HPLC chromatograms of corn infusion supernatants incubated with bacteria (5×10^8 CFU ml^{-1}) at 25°C for 24 h without and with zearalenone (ZEN, 5 µg ml^{-1}) (a), without and with fumonisins B_1 and B_2 (FB_1 and FB_2, 5 µg ml^{-1} each) (b), without and with deoxynivalenol (DON, 5 µg ml^{-1}) (c).

The percentage of mycotoxin removed was calculated by using the following formula: Mycotoxin removed (%) = 100 × [1 – (Peak area of mycotoxin in the supernatant / Peak area of mycotoxin in the positive control)].

HPLC mycotoxins analysis

Separation and quantification of mycotoxins were performed by the method described previously (Niderkorn *et al.* 2006) with slight modifications in order to remove interferences. The HPLC system consisted of a P1000XR pump (SpectraSYSTEM, San Jose, California, USA) and an automatic sampler (SpectraPhysics, San Jose, California, USA). Separation was performed on C_{18} reversed-phase columns (Macherey-Nagel, France); Nucleodur (125 × 4.6 mm, 5 mm) was used for DON and ZEN and Prontosil (120 × 3.0 mm, 3 µm) was used for FB_1 and FB_2. The mobile phase used to separate DON consisted of a water–acetonitrile solution (95:5 v/v) and the flow rate was 1 ml min^{-1}. Detection was set at 220 nm and retention time was 12.1 min. After 14 min of run, the column was washed with a water–acetonitrile solution (80:20 v/v) to remove interferences and was equilibrated with the mobile phase for 6 min before the following injection. The mobile phase used to separate ZEN consisted of a water–methanol solution (40:60 v/v) and the flow rate was 1.2 ml min^{-1}. ZEN was detected by photo-diode-array (scan 200 – 380 nm) and fluorescence (λ_{exc} = 274 nm, λ_{em} = 440 nm) placed in series. The retention time of ZEN was 10.7 min. Fumonisins were derivatized before injection using *ortho*-phtalaldehyde (OPA) plus mercaptoethanol. Ten µl of sample were mixed with 90 µl of borate buffer pH 10, then 100 µl of derivatizing reagent were added. The preparation was mixed and allowed to react for 2 min before injection. Separation of FB_1 and FB_2 was performed with a gradient elution using acetonitrile (A) and a mixture of 0.05 mol l^{-1} dihydrogen phosphate–methanol (1:1 v/v) acidified at pH 3.35 (B). The gradient program was as follows: 10% to 50% A in 6 min, 50% A for 7 min, and 50% to 10% A in 1 min. The flow rate was 1 ml min^{-1} and detection was set at 336 nm excitation and 440 nm emission. The retention times were 10.0 and 12.7 min for FB_1 and FB_2, respectively.

HPLC-ESI-MS/MS analysis

A HPLC-MS/MS (TSQ Quantum Ultra AM, Thermo Electron, San Jose, California, USA) equipped with an electrospray ionization source (ESI) interface operating in the negative mode was used to identify the ZEN derivative produced by some strains. Chromatographic separation and MS analysis was performed on a 125 × 4.6 mm Prontosil C_{18} column with particle size of 3 µm (Bischoff, Leonberg, Germany), using a methanol – 1% acetic acid

Table I. Product ions of zearalenone (ZEN), α zearalenol (α ZOL), and zearalanone (ZAN) for HPLC-ESI-MS/MS analysis

Compound	Retention time (min)	Transition	CE (V)
ZEN	11.01	317 → 130	46
		317 → 131	35
		317 → 149	35
		317 → 175	34
		317 → 187	30
		317 → 273	27
α-ZOL	9.59	319 → 130	54
		319 → 131	55
		319 → 160	37
		319 → 174	13
		319 → 275	31
		319 → 301	27
ZAN	9.90	319 → 137	52
		319 → 161	35
		319 → 163	38
		319 → 205	31
		319 → 259	37
		319 → 275	28

(65:35 v/v) mobile phase at a flow rate of 0.8 ml min^{-1}. Parameters of the MS were optimised using standard solutions of α ZOL in mobile phase. The test responses were recorded with electrospray voltage 3.0 kV, capillary temperature 400°C, sheath flow and auxiliary flow 50 and 10 arbitrary units, respectively. Multiple reaction monitoring (MRM) was used to identify the metabolite. The most intense transitions from the fragmentation of ZEN, α ZOL and ZAN were determined. Six product ions were selected at different collision energies (CE) so as to characterize each molecule of interest (Table I). For analysis, 4 ml of corn infusion sample were extracted with 4 ml dichloromethane. The mixture was mixed for 15 min then centrifuged at 3000 g for 10 min. One ml of the organic layer was transferred into a new tube and evaporated to dryness under a stream of N_2. The dried residue was redissolved in 200 µl of mobile phase, and 5 µl of this solution were injected into the HPLC-MS/MS system. MS-analysis of extract was compared with ZEN, α ZOL and ZAN standards.

Statistical analysis

Data was subjected to the analysis of variance (ANOVA). A significant difference ($p < 0.05$) between means was determined by Duncan's multiple range test using the Statistical Analysis System software package (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

The experimental model used in this work allowed to observe at the same time biotransformation and binding of *Fusarium* toxins by fermentative bacteria. The HPLC method used separated each mycotoxin as well as their main derivatives from the corn infusion medium matrix without an extraction step (Figure 1) and thus facilitated the screening.

Biotransformation of mycotoxins

In incubations containing DON and fumonisins no biotransformation products were observed. There were not peaks corresponding to DOM and aminopentol—derivatives of DON and fumonisins, respectively—or any other unknown peak in the HPLC chromatograms. In contrast, in incubations containing ZEN for 11 out of the 202 strains tested (about 5.5%), an additional peak was observed in the chromatograms. This peak had the same retention time for all 11 strains suggesting that it was the same metabolite (Figure 2). Eight out of the 11 strains were *Lactobacilli* and the other three were *Leuconostoc*. These

Table II. Lactic acid bacteria biotransforming zearalenone (ZEN) to α zearalenol (α ZOL)*

Taxon	Source	Used in	ZEN biotransformed (%)
Lactobacillus			
L. brevis	LGMPA - C11	Cheese making	41 (1)
L. brevis	Lallemand - R0002	Animal nutrition	47 (2)
L. brevis	Lallemand - L62	Baking	24 (1)
L. casei casei	LGMPA - B1	Cheese making	49 (4)
L. fermenti	LGMPA - 34	Cheese making	19 (0)
L. plantarum	LGMPA - J1	Cheese making	41 (2)
L. plantarum	Lallemand - R1113	Baking	50 (3)
L. spp.	LGMPA - F7	Cheese making	23 (1)
Leuconostoc			
Ln. mesenteroides or *Ln. pseudomesenteroides*	URF - 171	Cheese making	16 (2)
Ln. mesenteroides or *Ln. pseudomesenteroides*	URF - 365	Cheese making	8 (0)
Ln. mesenteroides	URF - 1118	Cheese making	9 (0)

*Bacteria (5×10^8 CFU ml^{-1}) were incubated for 24 h at 25°C in corn infusion, pH 4, containing ZEN (5 µg ml^{-1}). Data shown are the means (SD) of duplicate.

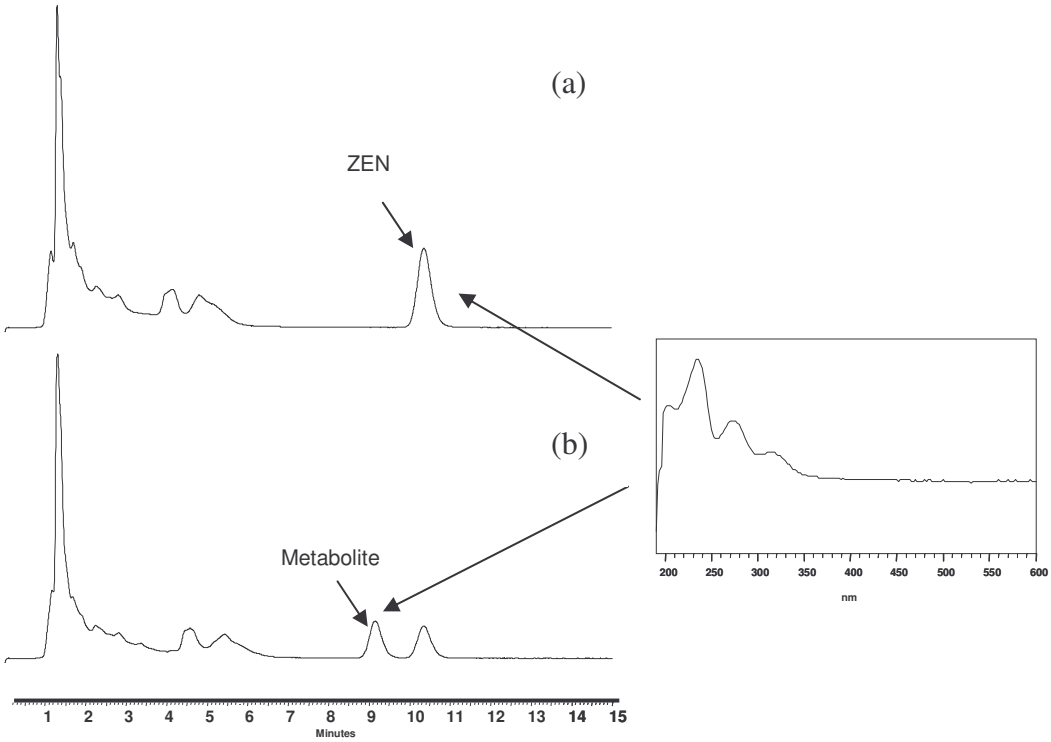


Figure 2. HPLC chromatograms of corn infusion supernatants containing zearalenone (ZEN, 5 µg ml^{-1}) incubated at 25°C for 24 h without bacteria (a) and with *Lactobacillus brevis* R0002 (5×10^8 CFU ml^{-1}) (b). ZEN (retention time = 10.4 min) and metabolite (retention time = 9.2 min) showed a similar UV spectrum (inset).

biotransforming *Lactobacilli* removed approximately twice more ZEN from the incubation media than strains from the same genus that only bound the mycotoxin (Table II and III).

The ZEN metabolite showed a UV spectrum similar to ZEN with absorption maxima at 236, 274, and 316 nm (Figure 2, inset). Retention time (Rt) of this peak was compared to those of main ZEN derivatives using modified chromatographic conditions to improve separation. The changes in the chromatography were in the mobile phase, which consisted in methanol – 1% acetic acid mixture (65:35 v/v), and the flow rate, which was set at 0.8 ml min^{-1}. Under these conditions, the Rt of the unknown metabolite was 9.56 min, similar to α ZOL (9.50 min), while Rts of β ZOL, α and β ZAL, and ZAN standards were 6.10, 7.74, 4.35, and 9.84 min, respectively. This result indicated that α ZOL was most likely the metabolite produced. The Rt of ZAN was also near to that of the unknown metabolite. However, ZAN, at a concentration of 5 μg ml^{-1} had a peak area considerably lower than the peak area of the metabolite produced by active bacterial strains incubated with an equal concentration of ZEN and hence ZAN was unlikely the searched compound. Additional HPLC-MS/MS analyses were performed on ZEN-containing corn infusion extracts after incubation with biotransforming strains. The LC-MS showed that the new peak had the same mass transitions characteristic (m/z = 319) as α ZOL (Figure 3) and thus unequivocally identified the metabolite.

Binding of zearalenone, deoxynivalenol and fumonisins from acidified corn infusion

Table III shows the mycotoxin-binding capacity of the tested fermentative bacteria grouped by genera. Across all genera, FB_2 was the mycotoxin most efficiently removed followed by ZEN, DON, and FB_1. The average fraction of DON bound by the different genera ranged from 15 to 22% but these differences were not significant ($p > 0.05$). In contrast, large differences among genera were observed for the binding of ZEN and fumonisins ($p < 0.05$). It is interesting to note that, independently of the molecular structure of these mycotoxins, the genera *Streptococcus* and *Enterococcus* ranked always as the most efficient binders under the conditions of the assay. In particular, strains of *Streptococcus thermophilus*, which bound up to 49%, 33%, 24%, and 62% of ZEN, DON, FB_1 and FB_2, respectively. Out of the 202 strains tested about two third were *Lactobacilli*. This apparent bias has a biotechnological explanation because species of this genus are very active during the ensiling process and hence widely used as inoculants. *Lactobacilli* are dominant members of the bacterial population found in grass and corn silages (Langston and Bouma 1960; Dellaglio and Torriani 1986). *L. plantarum*, of which we tested 46 isolates, is a particularly common epiphytic

Table III. *In vitro* binding of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON), and fumonisins B_1 and B_2 (FB_1, FB_2) by different genera of fermentative bacteria*

Genus	Number of strains	Fraction bound (%)†			
		ZEN‡	DON	FB1	FB2
Enterococcus	4	35 (2) [c]	22 (8)	14 (7) [b]	43 (8) [b]
Lactobacillus	137	20 (4) [b]	15 (9)	10 (6) [ab]	24 (11) [a]
Lactococcus	17	17 (4) [ab]	18 (8)	11 (4) [ab]	19 (8) [a]
Leuconostoc	6	28 (7) [bc]	18 (2)	4 (3) [a]	18 (5) [a]
Pediococcus	2	17 (2) [ab]	18 (3)	4 (3) [a]	23 (10) [a]
Propionibacterium	5	10 (3) [a]	18 (6)	10 (7) [ab]	15 (7) [a]
Streptococcus	31	40 (4) [c]	18 (7)	15 (5) [b]	48 (9) [b]

*Bacteria (5×10^8 CFU ml^{-1}) were incubated for 24 h at 25°C in corn infusion, pH 4, containing ZEN, 5 µg ml^{-1}, DON, 5 µg ml^{-1}, and a mixture of FB_1 and FB_2, 5 µg ml^{-1} each. Each strain was tested for each mycotoxin in duplicate.
†Values are the means (SD) of mycotoxin bound for all strains belonging to the same genus. Data within a column with different letters are significantly different ($p < 0.05$).
‡To show only binding, strains biotransforming ZEN were not included.

Table IV. *In vitro* binding of zearalenone, deoxynivalenol, and fumonisins B_1 and B_2 by *Lactobacillus* species

Lactobacillus species	Number of strains	Fraction bound (%)†			
		ZEN‡	DON	FB1	FB2
L. acidophilus	7	19 (4)	22 (4) [c]	13 (6) [b]	22 (10) [abc]
L. brevis	5	20 (1)	19 (5) [c]	9 (4) [ab]	27 (9) [bcd]
L. buchneri	3	20 (2)	4 (4) [ab]	11 (1) [ab]	28 (12) [cd]
L. casei . subsp. *alactosus*	1	18 (0)	10 (0) [abc]	3 (0) [a]	9 (0) [a]
L. casei . subsp. *casei*	21	18 (4)	17 (9) [c]	11 (5) [ab]	25 (11) [bcd]
L. casei . subsp. *rhamnosus*	4	18 (6)	19 (6) [c]	12 (7) [ab]	13 (3) [ab]
L. delbruekii . subsp. *bulgaricus*	5	28 (4)	11 (9) [abc]	12 (5) [ab]	26 (7) [bcd]
L. delbruekii . subsp. *lactis*	3	22 (5)	19 (9) [c]	9 (4) [ab]	23 (9) [abc]
L. fermentum	10	21 (7)	13 (8) [abc]	13 (12) [b]	25 (11) [bcd]
L. helveticus	8	19 (2)	17 (7) [c]	11 (6) [ab]	31 (9) [cd]
L. jugurti	7	19 (4)	20 (9) [c]	12 (7) [ab]	34 (9) [cd]
L. paraplantarum	7	22 (2)	13 (8) [abc]	5 (4) [ab]	10 (6) [a]
L. pentosus	1	23 (0)	2 (0) [a]	4 (0) [ab]	32 (0) [cd]
L. plantarum	46	19 (3)	13 (9) [abc]	9 (5) [ab]	22 (10) [abc]
L. reuteri	1	17 (0)	15 (0) [bc]	21 (0) [c]	37 (0) [d]
L. unidentified	8	20 (2)	19 (9) [c]	8 (5) [ab]	26 (6) [bcd]

*Test conditions were similar to those shown in table III.
†Values are the means (SD) of mycotoxin bound for strains belonging to the same species. Data within a column with different letter are significantly different ($p < 0.05$).
‡To show only binding, strains biotransforming ZEN were not included.

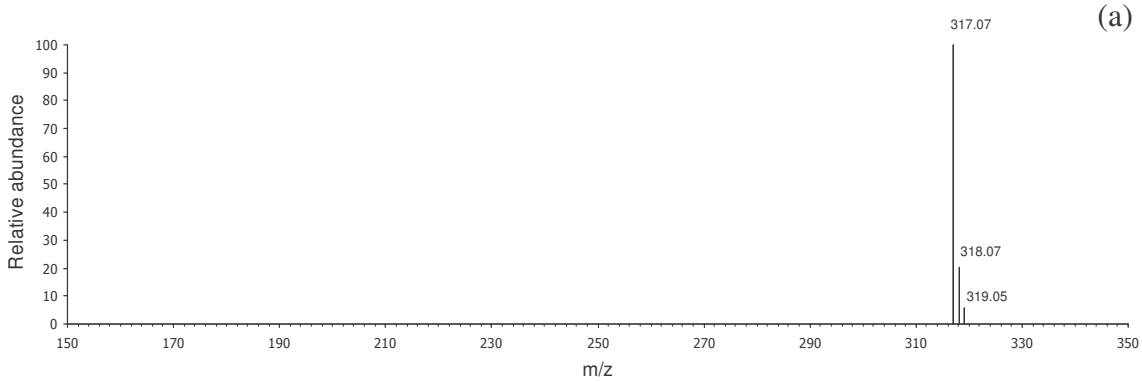
specie, which is also found in many commercial silage additives (Weinberg and Muck 1996). All the other selected strains used in this work are representative of genera of fermentative bacteria regularly associated with silage (Moon *et al.* 1981; Driehuis and Elferink 2000). The binding activities of *Lactobacillus* spp. are shown in Table IV. Significant differences were observed among strains; however, compared to *Streptococcus* and *Enterococcus* strains the binding capacity of the *Lactobacilli* was less important.

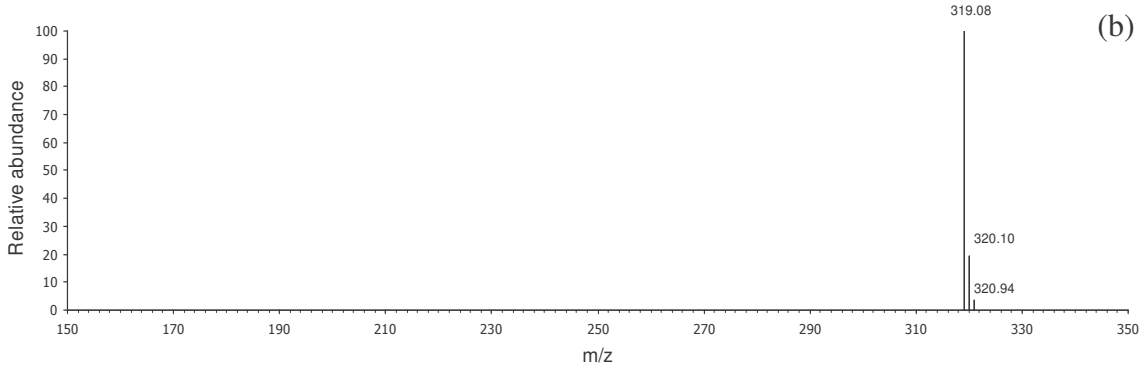
Discussion

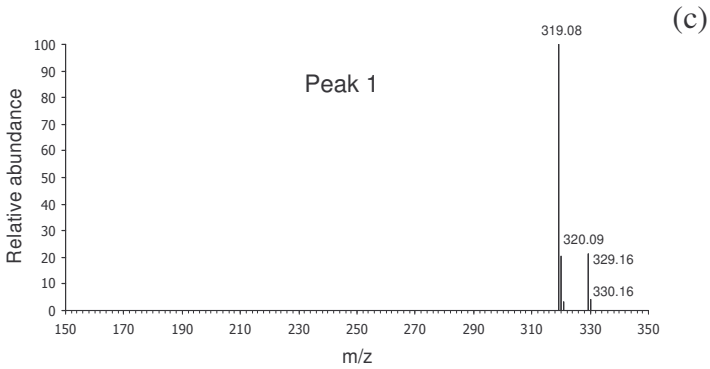
The ability of fermentative bacteria to biotransform or bind *Fusarium* toxins in whole-plant corn silage and fermented corn grain is a promising way to reduce their toxic effects on livestock. In this work, the conditions used to screen fermentative bacteria permitted to observe simultaneously binding and biotransformation in a liquid medium representative of corn silage.

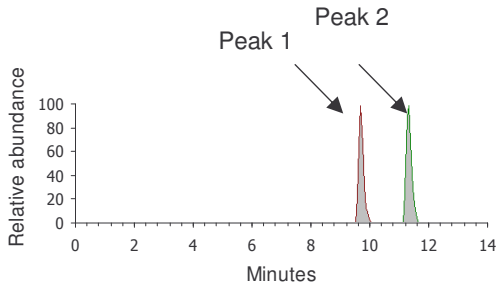
The reduction of ZEN into α ZOL can be carried out in the liver and also by the flora harboured in the digestive tract of animals (Olsen and Kiessling 1983; Kiessling *et al.* 1984; Kollarczik *et al.* 1994). However, it had never been observed with pure strains of lactic acid bacteria (LAB). In this study, this biotransformation was observed in 11 strains but it cannot be considered as a detoxification because α ZOL is three to four times more estrogenic than ZEN (Mirocha *et al.* 1979). All the positive bacterial strains detected in this work were capable to produce large quantities of α ZOL from ZEN. Even if strains possessing this property represent a relatively low percentage of the total fermentative bacteria, they could form part of the epiphytic population present in fermented feeds and convert significant amounts of ZEN into α ZOL. This means that the absence of ZEN or its presence in non toxic concentrations does not guarantee feed innocuity, and therefore, it could be advisable to check for the presence of α ZOL in fermented feeds. It could also be recommended to check if this property is not present in strains used as fermentation starters. The biotransformation of ZEN to α ZOL might explain the results of a recent study where a significant decrease in the concentration of ZEN was observed during the fermentation of corn meal by LAB but without a reduction in toxicity (Mokoena *et al.* 2005).

Binding of mutagens and mycotoxins by LAB was reported in numerous studies (Morotomi and Mutai 1986; El-Nezami *et al.* 1998). Binding of DON and ZEN by three probiotic strains was also recently reported, but they were not effective at the low densities found in fermented corn feeds (El-Nezami *et al.* 2002a; 2002b). The results of the present work showed that significant quantities of *Fusarium* toxins including fumonisins are bound









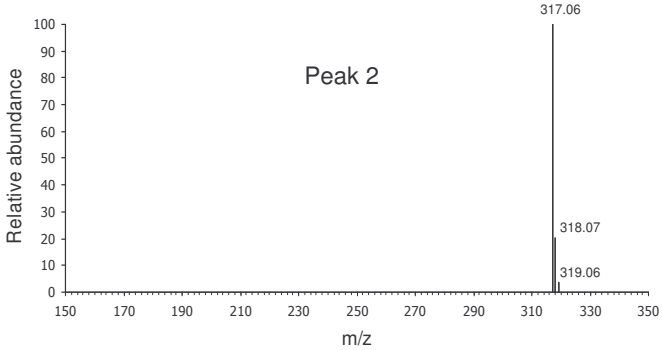


Figure 3. HPLC-MS spectra of zearalenone, ZEN (a) and α zearalenol, α ZOL (b) standards alone, and the extract from corn infusion supernatant containing ZEN and the produced metabolite (c). Spectra of peaks 1 and 2 showed parent mass of m/z 319.08 and 317.06, respectively.

by most species of fermentative bacteria at a density of 5×10^8 CFU ml^{-1}. We also confirmed previous observations (Niderkorn *et al.* 2006) showing that FB_2 was removed more efficiently than FB_1 in spite of their similarity in chemical structure.

Since most strains of fermentative bacteria tested seem to have the ability to bind DON, ZEN and fumonisins, it is probable that these *Fusarium* toxins are also partially bound by the epiphytic microflora of silage or by inoculants already utilized to improve silage fermentation or aerobic stability. Although *Lactobacilli* are widely utilized as silage additives, none of the strains tested was particularly efficient at binding *Fusarium* toxins. From the isolates tested in this work, the use of fermentative bacteria to bind *Fusarium* toxins in silage appear to be more advantageous for *Streptococci* and *Enterococci*, which bound more ZEN and fumonisins than other genera. Consequently, an advantageous use of fermentative bacteria to bind *Fusarium* toxins in silage would be limited to these two genera. The higher capacity to bind *Fusarium* toxins by *Streptococci* and *Enterococci* cannot be explained by their size as they are smaller than other genera with lower binding capacity such as *Lactobacillus*. The composition of the cell wall may confer the *Streptococci* and *Enterococci* their superior binding property. The mechanism of binding of mycotoxins by bacteria is still not clear. In the case of ZEN, it was recently suggested that this mycotoxin predominantly binds to carbohydrate moieties of the cell wall of LAB by means of hydrophobic interactions (El-Nezami *et al.* 2004). As hydrophobic interactions are relatively weak, this bacterium-mycotoxin complex could be unstable. Nevertheless, these authors also suggested that ZEN binding is not limited to hydrophobic links and other type of interactions could be important.

Conclusions

The use of selected strains of fermentative bacteria could be a method to limit the toxic effects of *Fusarium* toxins present in corn silage. Our results have shown that the biodegradation of mycotoxins is possible. However, the resulting compound is not always less toxic than the parent mycotoxin. Binding seems to be the most promising mode of action, but for the practical application of this technology, it is essential that the bacterium-mycotoxin complex remain stable during the digestion process. Further studies are planned to evaluate the stability of the complex in the different parts of the gastrointestinal tract of farm animals.

References

Bata, A. and Lasztity, R. (1999) Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology* **10**, 223-228.

Caloni, F., Spotti, M., Auerbach, H., Op den Camp, H., Gremmels, J.F. and Pompa, G. (2000) *In vitro* metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. *Veterinary Research Communications* **24**, 379-387.

Dellaglio, F. and Torriani, S. (1986) DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *Journal of Applied Bacteriology* **60**, 83-92.

Diaz, D., Hopkins, B., Leonard, L., Hagler, W. and Whitlow, L.W. (2000) Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **83**, 1171(Abstr.).

Diekman, M.A. and Green, M.L. (1992) Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* **70**, 1615-1627.

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

Driehuis, F. and Elferink, S. (2000) The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Veterinary Quarterly* **22**, 212-216.

El-Nezami, H., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002a) Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants* **19**, 680-686.

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 321-326.

El-Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1999) Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1, from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection* **63**, 549-552.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2004) Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4577-4581.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002b) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3545-3549.

El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002a) Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Additives and Contaminants* **19**, 680-686.

El-Nezami, H.S., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002b) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3545-3549.

Eriksen, G.S. and Pettersson, H. (2004) Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* **114**, 205-239.

Guerre, P. (2000) Interest of the treatments of raw materials and usage of adsorbents to decontaminate animal food containing mycotoxins. *Revue De Medecine Veterinaire* **151**, 1095-1106.

Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E. and Cole, J.R. (1990) Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **2**, 217-221.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. and Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters* **122**, 179-188.

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

Kollarczik, B., Gareis, M. and Hanelt, M. (1994) *In vitro* transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Natural Toxins* **2**, 105-110.

Langston, C.W. and Bouma, C. (1960) A study of the microorganisms from grass silage. II. The *Lactobacilli*. *Applied Microbiology* **8**, 223-234.

Lepom, P., Knabe, O. and Baath, H. (1990) Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize. 6. Formation of zearalenone and trichothecenes type A by indigenous *Fusarium* isolates. *Archives of Animal Nutrition* **40**, 871-883.

Malik, A.C., Reinbold, G.W. and Vedamuthu, E.R. (1968) An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. *Canadian Journal of Microbiology* **14**, 1185-1191.

Mesterhazy, A. (1989) Progress in breeding of wheat and corn genotypes not susceptible to infection by fusaria. In *Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* ed. Chelkowski, J. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands, pp.357-377.

Mirocha, C.J., Schauerhamer, B., Christensen, C.M., Niku-Paavola, M.L. and Nummi, M. (1979) Incidence of zearalenol (*Fusarium* mycotoxin) in animal feed. *Applied and Environmental Microbiology* **38**, 749-750.

Mokoena, M.P., Chelule, P.K. and Gqaleni, N. (2005) Reduction of fumonisin B1 and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal. *Journal of Food Protection* **68**, 2095-2099.

Moon, N.J., Moon, L.C., Ely, L.O. and Parker, J.A. (1981) Lactic acid bacteria active during the fermentation of wheat silage in small scale silos. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **13**, 248-250.

Morotomi, M. and Mutai, M. (1986) *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *Journal of the National Cancer Institute* **77**, 195-201.

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

Olsen, M. and Kiessling, K.H. (1983) Species differences in zearalenone-reducing activity in subcellular fractions of liver from female domestic animals. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* **52**, 287-291.

Orsi, R.B., Correa, B., Possi, C.R., Schammass, E.A., Nogueira, J.R., Dias, S.M.C. and Malozzi, M.A.B. (2000) Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *Journal of Stored Products Research* **36**, 75-87.

Pagliuca, G., Zironi, E., Ceccolini, A., Matera, R., Serrazanetti, G.P. and Piva, A. (2005) Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B1 and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* **819**, 97-103.

Scott, P.M. (1998) Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Medecine Veterinaire* **149**, 543-548.

Scudamore, K.A. and Livesey, C.T. (1998) Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**, 1-17.

Seeling, K. and Danicke, S. (2005) Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences* **14**, 3-40.

Styriak, I. and Conkova, E. (2002) Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. *Veterinary and Human Toxicology* **44**, 358-361.

Trenholm, H.L., Prelusky, D.B., Young, J.C. and Miller, J.D. (1989) A practical guide to the prevention of *Fusarium* mycotoxins in grain and animal feedstuffs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**, 443-451.

Weinberg, Z.G. and Muck, R.E. (1996) New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* **19**, 53-68.

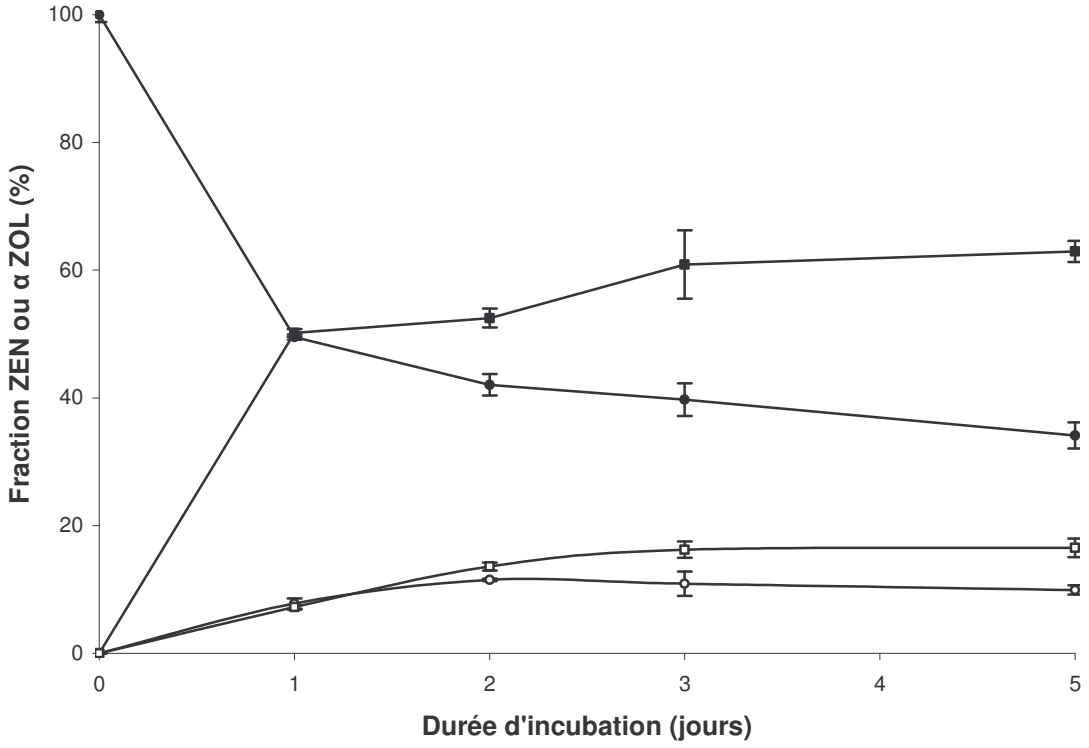


Figure 6. Cinétique de biotransformation de la zéaralénone (ZEN) en α zéaralénol (α ZOL) par *Lactobacillus brevis* R0002 (essai 1). Les bactéries (5×10^8 UFC/ml) ont été incubées pendant 0, 1, 2, 3 et 5 jours à 25°C dans de l'infusât de maïs acidifié à pH 4 et contenant 5 µg/ml de ZEN. Les courbes représentent les fractions de ZEN (●) et d'α ZOL (■) dans le surnageant et les fractions de ZEN (○) et d'α ZOL (□) dans le culot bactérien. Les résultats présentés sont la moyenne et l'écart type (barres d'erreur) d'essais réalisés en triple.

3. Biotransformation de la zéaralénone en α zéaralénol: essais complémentaires

3.1 Cinétiques de biotransformation en infusât de maïs

Onze souches (8 *Lactobacilli* et 3 *Leuconostoc*) sur les 202 testées ont été capables de biotransformer la ZEN en un même métabolite, l'α ZOL, dont l'identification a été réalisé par LC-MS/MS. Dans les conditions du test *in vitro*, cette biotransformation est partielle : entre 8 et 50% de la quantité initiale de ZEN est biotransformée après 24 h d'incubation à 25°C. Cette transformation partielle pourrait s'expliquer par une durée d'incubation relativement courte. Afin de visualiser une éventuelle poursuite de la réaction, une cinétique a été réalisée sur plusieurs jours avec une souche active, *Lb. brevis* R0002. L'objectif est de savoir si la réduction de la ZEN en α ZOL peut être totale et surtout, si l'α ZOL peut lui-même être biotransformé en un autre métabolite qui serait, lui, moins toxique que la ZEN.

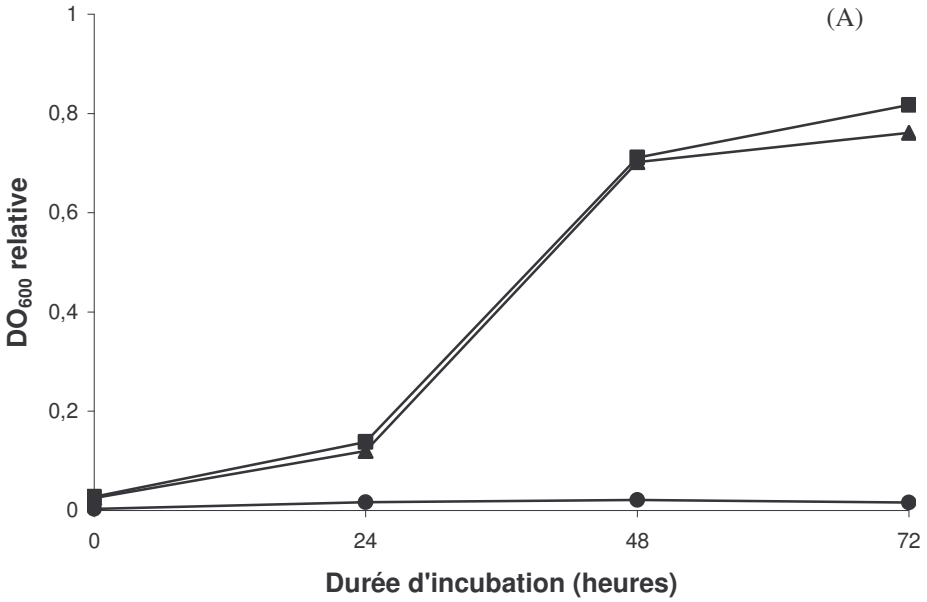
3.1.1 Essai 1

Une première cinétique a été réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le criblage de souches (mise en contact de 5×10^8 UFC/ml dans de l'infusât de maïs acidifié contenant 5 µg ZEN/ml), mais en prolongeant la durée d'incubation à 5 jours. Le dosage de la ZEN et de ses principaux métabolites a été effectué dans le surnageant et le culot bactérien[1] immédiatement après addition de la ZEN et après 0, 1, 2, 3 et 5 jours d'incubation. Chaque temps a été réalisé en triple. La DO_{600} du milieu a été mesurée.

Résultats. Après 24h d'incubation, le taux de biotransformation de la ZEN en α ZOL par *Lb. brevis* R0002 était similaire à celui observé lors du criblage de souches (environ 50%) (**figure 6**). Ce taux est resté relativement stable entre 1 et 5 jours d'incubation, et l'α ZOL n'a pas été transformé en un autre produit. Aux différents temps d'incubation, environ 20% de la ZEN et de l'α ZOL présents dans le milieu ont été séquestrés par les bactéries. La DO_{600} du milieu n'a pas évoluée au cours de la période d'incubation, indiquant une absence de croissance bactérienne.

Conclusion. Dans les conditions de l'essai, la biotransformation de la ZEN en α ZOL est rapide (< 24h) mais reste partielle. Les concentrations de ZEN et d'α ZOL évoluent peu jusqu'à au moins 5 jours d'incubation. Le suivi turbidimétrique des essais n'a pas indiqué de

[1] Mode opératoire *Dosage de la zéaralénone et de l' α zéaralénol dans le culot bactérien* (**annexe 6**)



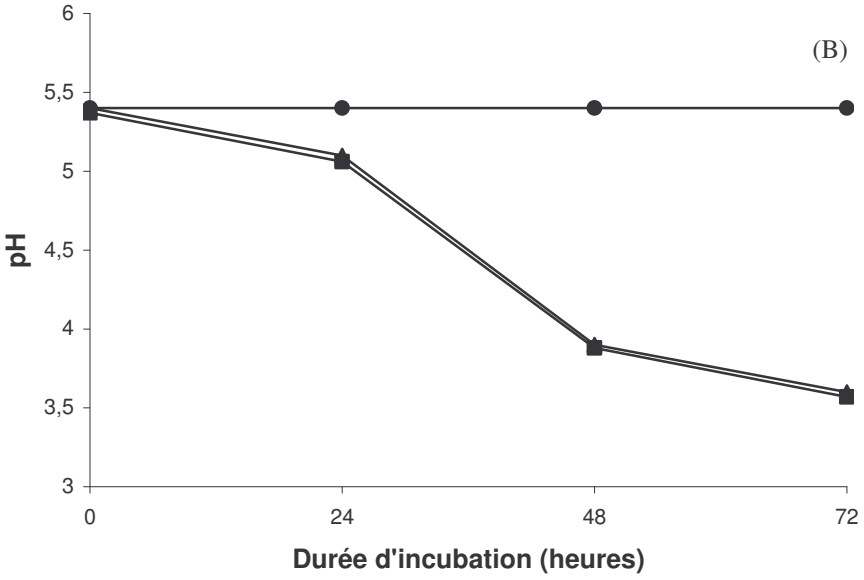


Figure 7. Evolution de la DO_{600} relative (A) et du pH (B) lors de l'incubation pendant 24, 48 et 72 h à 25°C de l'infusât de maïs non préalablement acidifié, ensemencé avec *Lactobacillus brevis* R0002 (10^3 UFC/ml) en présence de zéaralénone (ZEN) (5 µg/ml) (▲), avec les bactéries et sans ZEN (■), sans bactéries et sans ZEN (●) (essai 2).

croissance de la souche, ce qui pourrait expliquer en partie l'absence de biotransformation totale. Le caractère incomplet de la réaction pourrait être également du à un pH non optimal ou à une cytotoxicité de la ZEN ou de l'α ZOL envers les cellules bactériennes. D'autre part, il est intéressant de noter que les bactéries, qui séquestrent une fraction de la ZEN et de l'α ZOL contenus dans le milieu, ne relarguent pas les toxines au cours de la période d'incubation.

3.1.2 Essai 2

N'ayant pas observé de croissance bactérienne dans l'essai 1 en raison d'une concentration cellulaire initiale élevée, une deuxième cinétique a été réalisée en ensemençant un infusât de maïs non préalablement acidifié (pH 5,4) avec 10^3 UFC/ml. L'infusât a été contaminé avec différentes concentrations de ZEN (1, 2 ou 5 µg/ml). Après 24, 48 et 72 h d'incubation à 25°C, la ZEN et l'α ZOL ont été dosés dans le surnageant et le culot bactérien. Pour étudier la cytotoxicité de la ZEN sur les bactéries, la DO_{600} et le pH du milieu contenant la plus forte concentration de toxine (5 µg/ml) ont été mesurés après chaque temps d'incubation et comparés à des témoins sans toxine ou sans bactéries. Chaque essai a été réalisé en triple.

Résultats. La croissance de *Lb. brevis* R0002, mesurée par l'augmentation de la DO_{600} et la diminution du pH, n'a pas été affectée par la présence de ZEN à une concentration initiale de 5 µg/ml (**figure 7**). Après 72 h d'incubation, l'estimation de la concentration bactérienne était de $3,7 \times 10^8$ UFC/ml, soit moins que le taux d'ensemencement utilisé dans l'essai 1. Malgré une croissance bactérienne importante, seulement 30 à 40% de la ZEN a été transformée en α ZOL (**figure 8A**). Quelle que soit la concentration de ZEN initiale, le taux de transformation est similaire, et ceci, aux différents temps d'incubation. Nous n'avons pas détecté d'autres métabolites que l'α ZOL. Les fractions de ZEN et d'α ZOL séquestrées étaient également similaires quelque soit la concentration de ZEN initiale (**figure 8B**).

Conclusion. La comparaison des résultats obtenus dans les essais 1 et 2 indique que le taux de biotransformation de la ZEN est plutôt lié à la concentration bactérienne maximale dans le milieu qu'à la présence d'une croissance. Nous avons montré que la ZEN et l'α ZOL ne sont pas cytotoxiques aux concentrations utilisées envers la souche bactérienne, ce qui est cohérent avec les observations de Muller et Seyfarth (1993). La similarité des taux de biotransformation aux différentes concentrations de ZEN initales semble indiquer que les

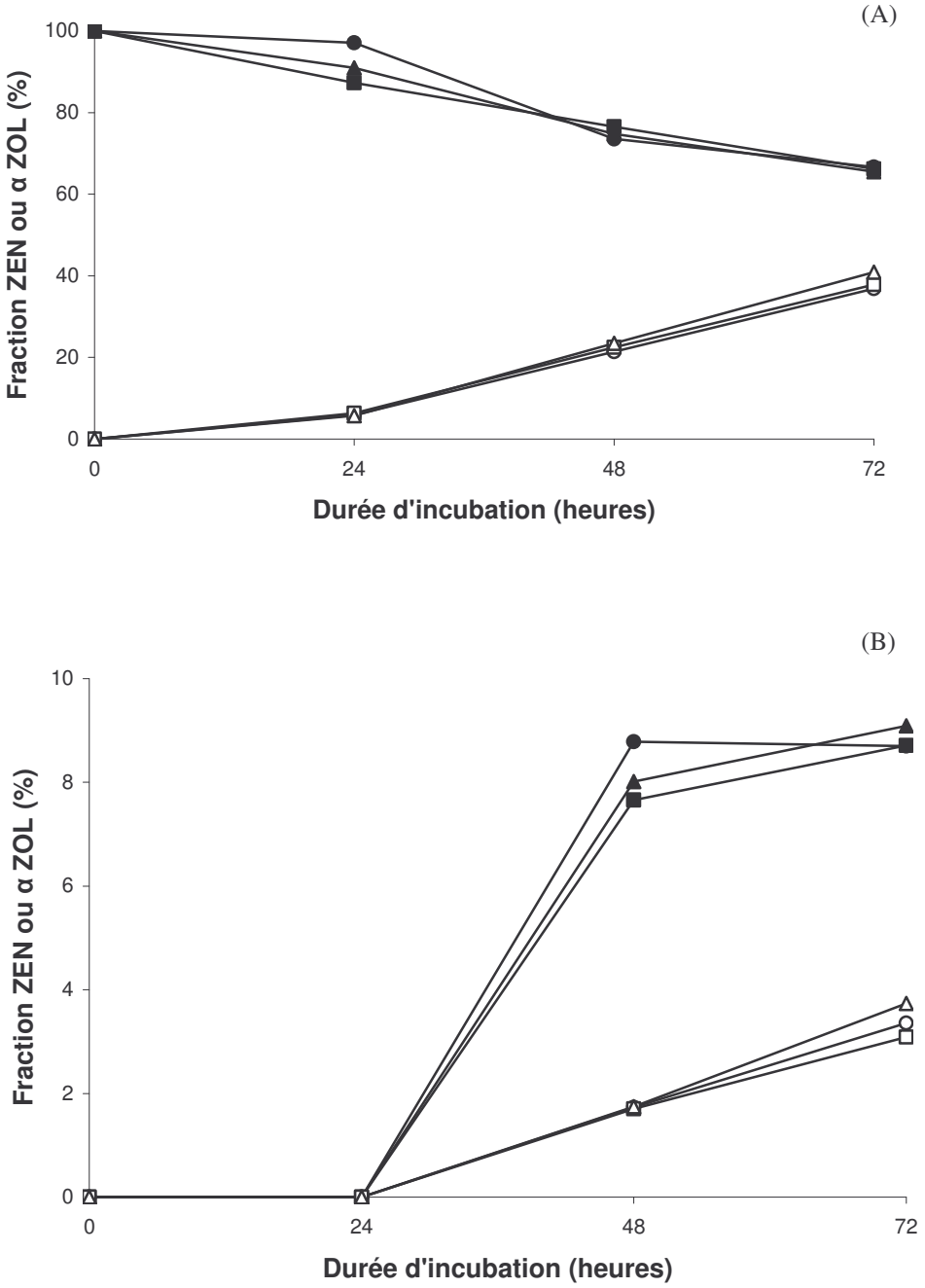


Figure 8. Cinétique de biotransformation de la zéaralénone (ZEN) en α zéaralénol (α ZOL) par *Lactobacillus brevis* R0002 (essai 2). Les bactéries (10^3 UFC/ml) ont été incubées pendant 24, 48 and 72 h à 25°C dans de l'infusât de maïs non acidifié contenant 1, 2 ou 5 µg/ml de ZEN. Les courbes en (A) représentent les fractions de ZEN éliminées (marques noires) et d'α ZOL produit (marques blanches) dans le surnageant lorsque la [ZEN] initiale = 1 µg/ml (●,○), 2 µg/ml (■,□) et 5 µg/ml (▲,Δ). Les courbes en (B) représentent les fractions de ZEN (marques noires) et d'α ZOL (marques blanches) dans le culot bactérien (même légende). Les résultats présentés sont les moyennes d'essais réalisés en triple.

enzymes n'étaient pas saturées par le substrat et donc que la quantité d'enzyme produite par les bactéries n'était pas limitante. De même, seule une partie de la ZEN et de l'α ZOL présents dans le milieu est séquestrée alors que les sites de fixation n'étaient pas saturés. Ces résultats concordent avec les travaux de El-Nezami (2002b; 2004) sur la séquestration de la ZEN et de l'α ZOL par les bactéries LGG et LC705.

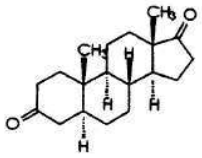
3.2 Hypothèse sur la nature de l'enzyme catalysant la réduction de la zéaralénone en α zéaralénol

Le potentiel oestrogénique du métabolite étant plus élevé que celui de la molécule-mère, la biotransformation de la ZEN en α ZOL au niveau hépatique est considérée comme un mécanisme de bioactivation de la ZEN (Everett *et al.* 1987). Bien que les souches bactériennes présentant cette activité ne soient pas utilisables comme agents détoxifiants, la mise en évidence de cette propriété chez certaines souches de bactéries lactiques n'est pas dénuée d'intérêt.

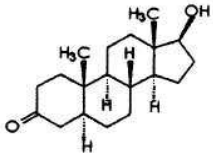
Un premier intérêt potentiel pourrait être la possibilité de produire industriellement de l'α ZOL à partir de la ZEN, par exemple, pour des applications analytiques. Un autre aspect est celui lié aux problèmes de sécurité alimentaire. Les bactéries lactiques étant présentes à de fortes concentrations dans plusieurs aliments fermentés susceptibles de contenir de la ZEN, elles pourraient amplifier les effets de cette fusariotoxine. D'après les résultats du criblage, seule une minorité de souches (environ 5%) sont capables de réaliser cette biotransformation. Cependant, une forte proportion de bactéries actives parmi la flore fermentaire d'un lot d'aliment contaminé par de la ZEN pourrait entraîner une concentration d'α ZOL non négligeable dans les ensilages, mais aussi dans les céréales fermentées destinés à la nutrition humaine (Haard *et al.* 1999) ou animale. Ces observations peuvent justifier l'identification de l'enzyme capable de catalyser cette biotransformation chez les bactéries lactiques.

Chez les mammifères, la réduction de la ZEN en α ZOL est décrite au niveau du foie de nombreuses espèces (rat, porc, homme, …) (Kiessling et Pettersson 1978; Olsen 1989; Malekinejad *et al.* 2006a). Cette réaction est catalysée par la 3α-hydroxystéroïde déshydrogénase (3α-HSD), une enzyme $NAD(P)^+$ dépendante qui intervient également dans le métabolisme des hormones stéroïdes en catalysant l'interconversion réversible des groupes hydroxy et oxo en position 3 du noyau stéroïde (Cheng *et al*. 1991; Jez *et al*. 1997b).

Réduction des substrats stéroïdiens

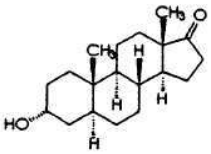


Androstanedione

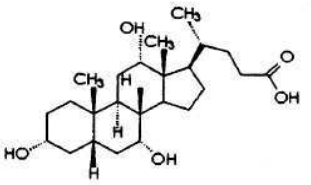


5α-DHT

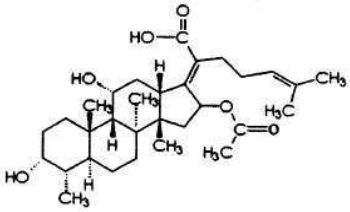
Oxydation des substrats stéroïdiens



Androstérone

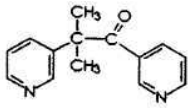


Acide cholique



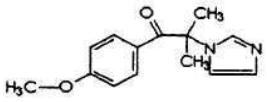
Acide fusidique

Réduction de xénobiotiques



Métyrapone

4-nitrobenzaldéhyde



NKI-42255

Figure 9. Substrats carbonylés stéroïdiens et non stéroïdiens de la 3α-HSD/CR de *Comamonas testosteroni*. L'acide fusidique, un antibiotique stéroïdien, est un produit de sécrétion du champignon *Fusidium coccineum*. Le produit NKI 42255 est un agent anti-insecte synthétique dérivé de la métyrapone, un inhibiteur de cytochrome P450. Abréviation : 5α-DHT, 5α-dihydrotestostérone (d'après Maser *et al.* 2001).

Chez les microorganismes, il est bien établi que cette biotransformation est réalisée par la microflore du rumen (Kiessling *et al*. 1984) et dans le colon de porc (Kollarczik *et al*. 1994) mais n'a jamais été mise en évidence chez une souche bactérienne isolée. Des enzymes 3α-HSD bactériennes sont cependant décrites pour leur action sur les stéroïdes chez *Eubacterium lentum* (MacDonald *et al*. 1979), *Clostridium perfringens* (Macdonald *et al*. 1976), *Pseudomonas putida* (Uwajima *et al*. 1978) *Comamonas* (*Pseudomonas*) *testosteroni* (Boyer *et al.* 1965; Skalhegg 1975; Maser *et al.* 1992; Oppermann et Maser 1996) et *Pseudomonas* spp. B-0831 (Suzuki *et al*. 1993; Ueda *et al*. 2004).

En dépit de spécificités de substrat similaires, les enzymes 3α-HSD eucaryotes et procaryotes proviennent de deux familles d'enzymes différentes : les aldo-céto réductases (aldo-keto reductases, AKR) (EC 1.1.1.213) et les déshydrogénases/réductases à courte chaîne (short-chain dehydrogenases/reductases, SDR) (EC 1.1.1.50), respectivement (Persson *et al*. 1991; Jornvall *et al*. 1995; Jez *et al*. 1997a; Kallberg *et al*. 2002). Leur structure est différente mais les deux types de HSD sont fonctionnellement similaires (Maser *et al.* 2001).

Comamonas testosteroni ATCC 11966 est une bactérie aérobie stricte et non fermentaire, capable de minéraliser les hormones stéroïdiennes en CO_2 et H_2O lorsqu'elle est cultivée sur un milieu de culture ne contenant que ces composés comme source de carbone et d'énergie (Marcus et Talalay 1956). La 3α-HSD de cette bactérie catalyse l'oxydo-réduction en C_3 du noyau stéroïde d'une large variété de stéroïdes $C_{19\text{-}27}$ et pourrait initier leur dégradation totale. La 3α-HSD de *C. testosteroni* est fonctionnelle pour catalyser l'oxydo-réduction de l'androstanedione, la 5α-dihydrotestostérone, l'androstérone, l'acide cholique et l'acide fusidique, un antibiotique stéroïdien produit par le champignon *Fusidium coccineum* (Oppermann *et al.* 1996; Oppermann et Maser 1996; Maser *et al.* 2000) (**figure 9**). Chez cette bactérie, une 3(17)β-HSD (EC 1.1.1.51) pouvant catalyser réversiblement l'oxydation de la testostérone en Δ^4-androstène-3,17-dione et du 17β-estradiol en estrone a également mise en évidence (Boyer *et al.* 1965). Par ailleurs, la transformation de la morphine en morphinone en présence d'une β-HSD de *C. testosteroni* a été reportée (Liras *et al.* 1975).

Il a été montré que la 3α-HSD de *C. testosteroni* ne catalyse pas seulement l'oxydoréduction du noyau stéroïde. Elle permet également la réduction de la fonction carbonyl (C=O) d'un certain nombre de composés non stéroïdiens (aldéhydes et cétones) parmi lesquels figurent certains xénobiotiques comme l'agent anti-insecte NKI 42255 [2-(1-

imidazolyl)-1-(4-méthoxyphényl)-2-méthyl-1-propanone], la métyrapone [2-méthyl-1,2-di-(3-pyridyl)-1-propanone], le *p*-nitrobenzaldéhyde et le *p*-nitroacétophénone (Maser *et al.* 1992; Oppermann et Maser 1996; Maser *et al.* 2000; Maser *et al.* 2001) (**figure 9**). Compte tenu de la variété de substrats dont elle catalyse l'oxydoréduction, il a été suggéré que la 3α-HSD contribue à des stratégies de défense de *C. testosteroni* contre des agents toxiques naturels et synthétiques (Maser *et al.* 2001) et qu'elle pourrait jouer un rôle significatif dans la biodégradation de substances hormonales actives dans l'environnement (Xiong *et al.* 2003). Dans ce contexte, la structure et le mode de régulation de cette enzyme sont actuellement activement étudiés (Maser *et al.* 2001; Xiong *et al.* 2001; Ueda *et al.* 2004; Hwang *et al.* 2005; Hoffmann *et al.* 2006; Xiong *et al.* 2006).

La 3α-HSD bactérienne pourrait donc catalyser la réduction de la ZEN en α ZOL, tout comme chez les eucaryotes. Si cette enzyme est capable de réduire la ZEN, il est possible que les souches de bactéries lactiques actives produisent également une enzyme de ce type. Nous nous sommes procurés la 3α-HSD de *C. testosteroni*, seule 3α-HSD bactérienne disponible, commercialisée par ailleurs pour son aptitude à oxyder l'androstérone en présence de β-NAD^+. Sans aller jusqu'à l'identification précise de l'enzyme catalysant la réduction de la ZEN en α ZOL, nous avons voulu vérifier l'hypothèse de sa capacité à catalyser cette biotransformation.

Deux essais de transformation de la ZEN par cette enzyme en présence de β-NADH ont été réalisés : l'un en milieu tampon à pH 6,5, et l'autre dans de l'infusât de maïs acidifié à pH 4 (conditions du criblage de souches dans lesquelles la réaction a été observée chez certaines bactéries lactiques).

Le protocole pour ces deux essais figure en **annexe 10**. Pour chacun d'eux, la concentration de β-NADH est de 1 mM. En l'absence de donnée sur la concentration de β-NADH nécessaire à la réaction de réduction de la ZEN, cette concentration est basée sur la réaction d'oxydation de l'androstérone (Hwang *et al.* 2005).

3.2.1 Essai 1

Cet essai de transformation a été réalisé en tampon phosphate 0,1M, pH 6,5. Ce pH a été choisi car l'activité de réduction de la ZEN par la 3α-HSD eucaryote est supérieure en milieu légèrement acide qu'à pH neutre (Malekinejad *et al.* 2005).

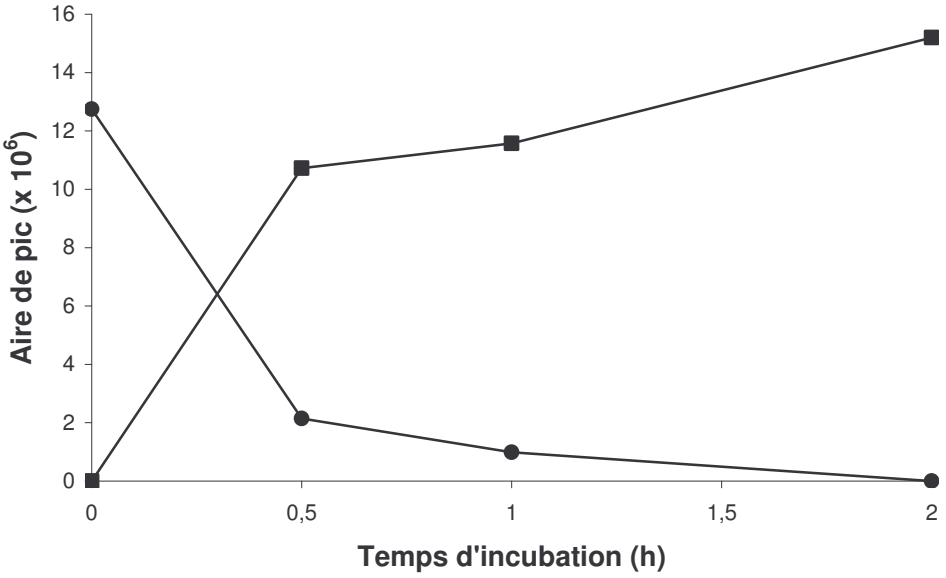


Figure 10: Réaction de réduction de la zéaralénone (ZEN) (●) en α zéaralénol (α ZOL) (■) en milieu tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5. La ZEN (5 µg/ml) a été incubée à 25°C avec 0,5 UI 3α-HSD/ml en présence de β-NADH (1 mM).

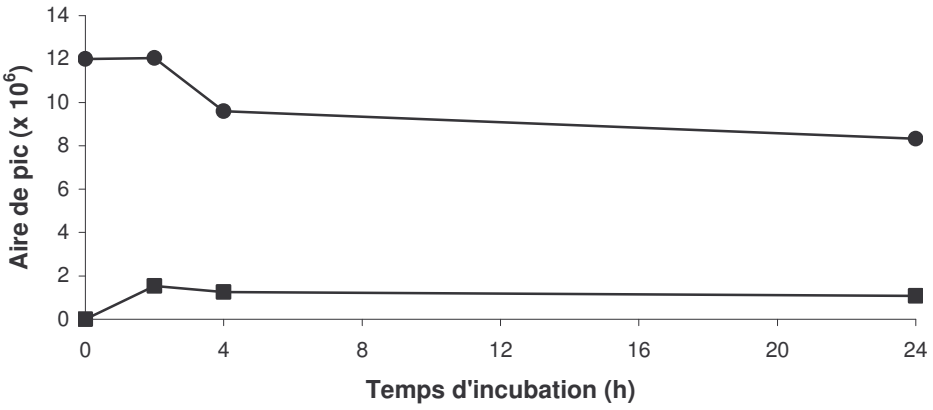


Figure 11 : Réaction de réduction de la zéaralénone (ZEN) (●) en α zéaralénol (α ZOL) (■) en infusât de maïs acidifié à pH 4. La ZEN (5 µg/ml) a été incubée à 25°C avec 0,5 UI 3α-HSD/ml en présence de β-NADH (1 mM).

Résultat. Dans ces conditions, le complexe 3α-HSD / β-NADH a réduit la totalité de la ZEN en α ZOL en 2 h (**figure 10**).

3.2.2 Essai 2

Afin de vérifier si cette activité enzymatique est conservée dans les conditions du criblage de souches, notamment en terme d'acidité du milieu réactionnel (pH 4), l'essai de biotransformation a été réalisé en remplaçant le tampon pH 6,5 par de l'infusât de maïs acidifié à pH 4 et en prolongeant la période d'incubation à 24 h.

Résultat. Dans ces conditions, seulement 10% de la ZEN a été réduite en α ZOL après 24 h d'incubation (**figure 11**). Un pH acide semble donc moins favorable à la catalyse. Cependant, cet essai montre que les conditions dans lesquelles les *Lactobacilli* et les *Leuconostoc* ont biotransformé la ZEN en α ZOL permettent également la même réaction par la 3α-HSD de *C. testosteroni*. Lors du criblage, la fraction de ZEN biotransformée par les bactéries fermentaires variait entre 8 et 50% selon les souches. Il est cependant difficile de comparer cette fraction avec celle mesurée au cours de cet essai puisque la quantité d'enzyme active produite par les bactéries est inconnue.

Bien qu'à notre connaissance, aucune 3α-HSD n'ait été décrite chez les bactéries lactiques, l'enzyme responsable de la réduction de la ZEN par certaines souches pourrait être similaire à celle de *C. testosteroni*. Une possibilité de vérifier cette hypothèse serait d'utiliser la technique PCR, mais pour cela, il faut disposer d'amorces permettant l'amplification du gène codant l'enzyme catalysant la réaction chez les bactéries lactiques. Il faut également que ces amorces n'amplifient pas chez les souches négatives. La séquence du gène codant la 3α-HSD de *C. testosteroni* est disponible (Mobus et Maser 1998). Cependant, en réalisant des alignements de séquences des 3α-HSD bactériennes disponibles, il s'avère que ces séquences sont très peu similaires, y compris entre les enzymes de deux souches de la même espèce *C. testosteroni* (Maser *et al.* 2001). De plus, pour ces deux 3α-HSD, les motifs conservés liés à la fixation du substrat et du co-facteur (site actif) sont spécifiques de la grande famille des SDR, plutôt que des 3α-HSD. En conséquence, il apparaît difficile de mettre au point des amorces spécifiques des 3α-HSD bactériennes. La caractérisation exacte de l'enzyme responsable de la réduction de la ZEN par les bactéries lactiques devrait pouvoir être réalisée en utilisant un outil comme l'électrophorèse bidimensionnelle. Plus simplement, la mise en évidence d'une

inhibition de la transformation de la ZEN par les bactéries lactiques actives en présence de substrats de la 3α-HSD pourrait également suggérer une compétition au site actif de l'enzyme.

Bien qu'il soit prématuré d'extrapoler la multiplicité de substrats de la 3α-HSD de *C. testosteroni* aux bactéries lactiques capables de réduire la ZEN en α ZOL, l'activité d'oxydoréduction de certains stéroïdes et xénobiotiques par ces bactéries pourrait être intéressante à tester. Compte tenu du caractère ubiquitaire des bactéries lactiques, certaines d'entre elles, appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc* selon nos résultats, pourraient contribuer à la dégradation de certains xénobiotiques carbonylés dans l'environnement, mais aussi dans les produits fermentés et le tractus digestif.

4. Potentiel de séquestration des fusariotoxines dans les ensilages par les bactéries fermentaires épiphytiques ou inoculées

Les bactéries lactiques semblent ne représenter qu'une minorité de la flore épiphytique du maïs plante entière et de l'herbe (Lin *et al.* 1992a) mais leur croissance est favorisée à la mise en silo grâce à leur capacité à poursuivre leur croissance en atmosphère microaérophile et lorsque le milieu s'acidifie. La densité et la composition de la microflore épiphytique varient selon la nature des végétaux (Elhimdy et Pahlow 1994), le lieu de culture (Lin *et al.* 1992b), le stade de maturité des végétaux , le mode de fertilisation (Adler et Lew 1995), le mode de récolte (Lin *et al.* 1992b; Pahlow *et al.* 1995; Adler *et al.* 1997) et le pré-fanage (Muller *et al.* 1993). La densité microbienne lactique d'origine épiphytique dans les fourrages est quantitativement moins importante dans le ray-grass (10^2 à 10^3 UFC/g) que dans le maïs plante entière (10^4 à 10^5 UFC/g de fourrage) (Lin *et al.* 1992a). Si cette microflore est en concentration suffisante (>10^5 UFC/g de fourrage), que la teneur en glucides solubles du fourrage est supérieure à 11-12 % de matière sèche et que le pouvoir tampon n'est pas trop élevé, une acidification rapide et suffisante du fourrage ensilé peut être obtenue. C'est généralement le cas pour les ensilages de maïs plante entière lorsqu'ils sont récoltés avec une teneur en matière sèche de 32 à 35 % (stade pâteux-vitreux du grain). Pour les ray-grass, une bonne qualité de conservation est rarement obtenue car la vitesse d'acidification est insuffisante en raison d'un développement trop lent de la fermentation lactique. L'emploi, au moment de la récolte, d'un inoculant contenant des bactéries lactiques sélectionnées peut alors pallier le déficit de ferments lactiques naturellement présents.

Le taux d'inoculation recommandé des conservateurs biologiques d'ensilage (10^5 à 10^6 bactéries/g fourrage vert) est souvent suffisant pour que les bactéries inoculées surpassent les bactéries lactiques épiphytiques et deviennent la population prédominante dans l'ensilage (Weinberg et Muck 1996b; Kung *et al.* 2003). Bien que le genre *Lactobacillus* (principalement les espèces *Lb. plantarum* et *Lb. buchneri*), soit le genre le plus représenté dans les conservateurs biologiques d'ensilage, l'espèce *Enterococcus faecium* (Agri-King ; Pioneer 1188™ et 1174™), certaines espèces de *Pediococcus* (Lalsil® CL et Lalsil® PS, Lallemand ; Biomate LP/PC™, Chr. Hansen Biosystems) ou de *Propionibacterium* (Lalsil® MS01, Lallemand) y sont parfois associées (Weinberg *et al.* 1993; Weinberg et Muck 1996b). Alors que les *Lactobacilli* se développent davantage lorsque le pH est inférieur à 5, *Enterococcus faecium* peut croître fortement dans les premiers stades du processus d'ensilage en consommant rapidement l'oxygène résiduel dans la masse (Seale 1986). Les *Pediococci* assurent également une acidification rapide des végétaux ensilés et certaines espèces peuvent fermenter les pentoses produits par l'hydrolyse des hémicelluloses (Stokes et Chen 1994). Les *Streptococci*, jusqu'ici non incorporés dans les inoculants commerciaux, apparaissent également comme de bons candidats comme le montre une étude avec l'espèce ruminale *Streptococcus bovis* (Jones *et al.* 1991).

Compte tenu de ces éléments et des résulats obtenus, l'emploi d'un inoculant contenant Enterococcus faecium pourrait, en plus de son rôle acidifiant, assurer une séquestration des fusariotoxines plus efficace que dans les ensilages traités avec un inoculant ne contenant pas cette espèce, et ceci dès le début de la conservation. La flore fermentaire étant plus diversifiée dans les ensilages non inoculés, la fraction de fusariotoxines séquestrées devrait également y être moins élevée. Le potentiel de séquestration des mycotoxines pourrait donc être un paramètre à intégrer avantageusement lors de la sélection de souches bactériennes incorporées aux conservateurs biologiques d'ensilage. Le devenir du complexe bactérie-mycotoxine dans le TGI des animaux doit cependant être étudié pour savoir si une diminution de la biodisponibilté des toxines peut réellement être observée avec des souches actives en situation de terrain.

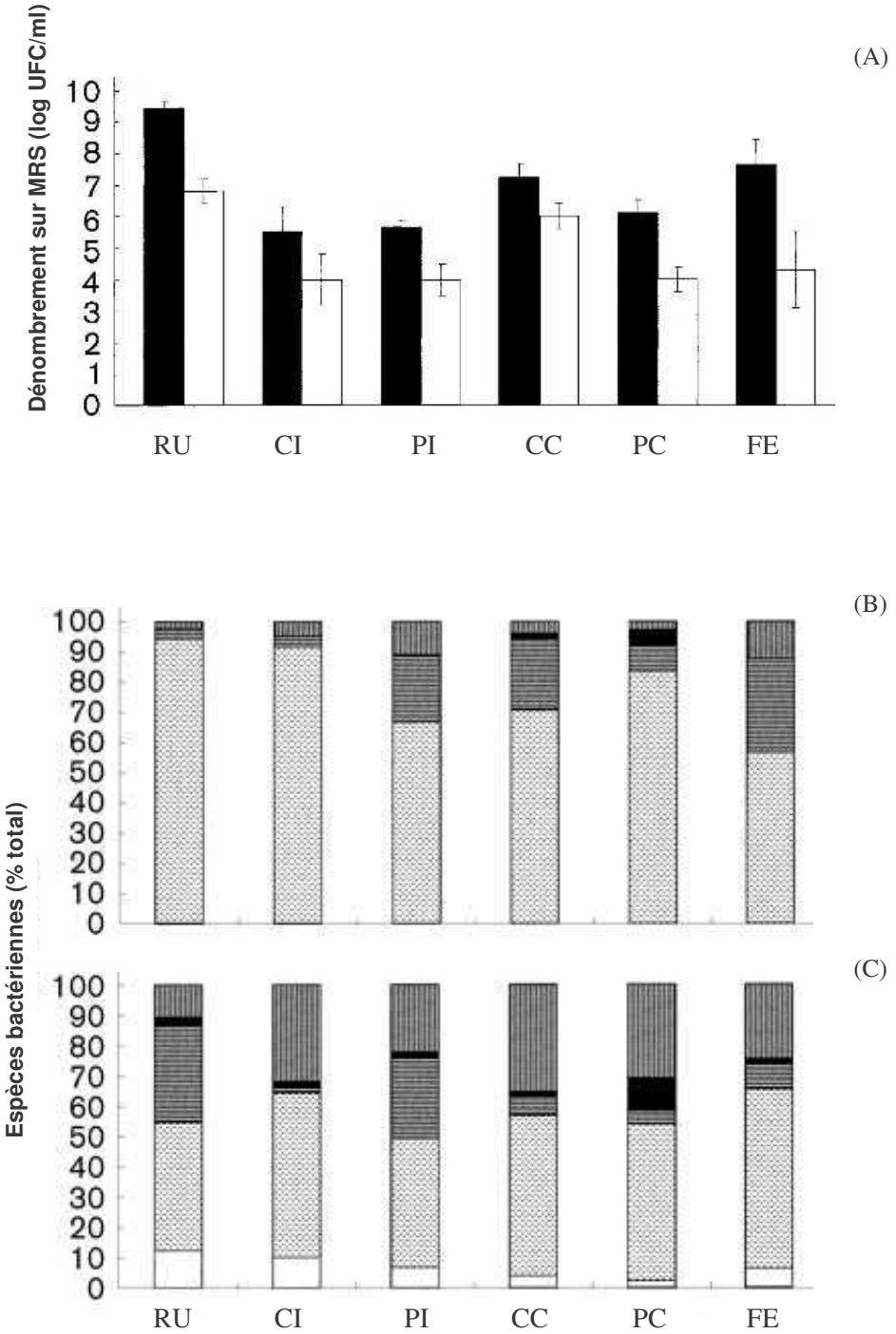


Figure 12. Nombre d'isolats sur milieu MRS obtenus à partir des contenus digestifs de bovins ayant consommé des rations riches en grain (barres noires) ou riches en fibres (barres blanches) (A). Composition de la microflore du contenu et de la paroi de différents compartiments du tractus digestif de bovins ayant consommé des rations riches en fibres (B) ou en grain (C). RU, contenu ruminal; CI, contenu de l'ileum; PI, paroi de l'ileum; CC, contenu du côlon; PC, paroi du côlon; FE, fèces. Barres blanches, *Megasphaera elsdenii*; points, *Streptococcus bovis*; hachures horizontales, *Selenomonas ruminantium*; barres noires, *Acidaminococcus fermentans*; hachures verticales, *Lactobacillus spp.* (d'après Krause *et al*. 2003)

II. DEVENIR DU COMPLEXE BACTERIE – FUSARIOTOXINE DANS LE TRACTUS DIGESTIF

Que deviennent les bactéries lactiques et les fusariotoxines présentes dans l'ensilage, complexées ou non, après leur ingestion ?

Chez les ruminants, des essais montrent que les bactéries lactiques de l'ensilage passent dans le contenu ruminal et y survivent (Weinberg *et al.* 2003). Bien que certaines souches soient particulièrement sensibles à la prédation par les protozoaires (Sharp *et al.* 1994), la concentration de bactéries lactiques dans le rumen est généralement comprise entre 10^6 et 10^9 bactéries/ml de contenu (Weinberg *et al.* 2004a). Dans les différents compartiments du TGI des ruminants, les bactéries lactiques sont en nombre plus important lorsque le régime est riche en grain, c'est-à-dire en sucres fermentescibles, que lorsqu'il est riche en fibres (**figure 12A**) (Krause *et al.* 2003). Les espèces de bactéries lactiques trouvées dans l'intestin postérieur sont typiquement celles trouvées au niveau ruminal. L'espèce prédominante dans le rumen, l'ileum et le côlon apparaît être *Streptococcus bovis* et ceci, d'autant plus que le régime est riche en fibres (**figure 12B**). La proportion de *Lactobacillus* spp. dans la microflore totale de ces compartiments digestifs est, en revanche, largement augmentée lorsque le régime est riche en grain (**figure 12C**). Chez le porc, la concentration de bactéries lactiques dans le TGI varie entrée 10^7 et 10^9 bactéries/ml (**tableau 5**) (Mikkelsen *et al.* 2004; Hojberg *et al.* 2005). Des essais montrent qu'une souche de bactérie lactique utilisée comme inoculant pour acidifier un aliment reste fortement présente tout au long du TGI du porc. Lorsque ces animaux sont nourris avec des aliments fermentés par *Lb. plantarum*, cette espèce devient majoritaire dans le contenu des différents compartiments du TGI (estomac, ileum, caecum, côlon, rectum) à une concentration égale à environ 10^8 bactéries/ml dans tous les compartiments (van Winsen *et al.* 2001).

La densité de bactéries lactiques dans le contenu ruminal et le TGI du porc correspond donc approximativement à la limite à partir de laquelle nous avons observé une séquestration des fusariotoxines au cours de nos essais. La nature des espèces bactériennes présentes dans le TGI pourrait donc être déterminante pour contribuer à protéger (ou non) les animaux des effets des fusariotoxines. Cependant, pour qu'une diminution réelle de l'absorption de ces fusariotoxines dans l'organisme et qu'un effet protecteur contre leurs effets toxiques puissent

Tableau 5. Composition de la microflore de différents compartiments du tractus gastrointestinal de porc.

	ESTOMAC		INTESTIN GRELE		CAECUM		COLON	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
Anaérobies cultivables totaux (log UFC/g)	7 - 8	8 - 9	8 - 9	8 - 9	9 - 10	9 - 10	10	9 - 10
Bactéries lactiques (log UFC/g)		7 - 9		7 - 9		8 - 9		8 - 9
Lactobacilli (log UFC/g)	7	7 - 9	8	7 - 9	9	8 - 9	9	8 - 9
Enterococci (log UFC/g)		4 - 5		4 - 6		4 - 6		4 - 6
Entérobactéries (log UFC/g)	5		6 - 7		7		7	
Coliformes (log UFC/g)		5 - 6		7-8		7 - 9		7 - 9
Levures (log UFC/g)	3 - 4	4	4 - 5	4 - 5	4 - 5	4 - 5	4 - 5	4 - 5

(A) Mikkelsen et Jensen, 2004; (B) Hojberg et al, 2005

être observés, la stabilité du complexe bactérie-fusariotoxine dans les compartiments du TGI où elles peuvent être absorbées est essentielle.

1. Choix du modèle d'étude

La stabilité du complexe bactérie-fusariotoxine dans le contenu ruminal de mouton et dans des conditions simulant les compartiments post-ruminaux des ruminants (abomasum et intestin grêle) a été étudiée en prenant le complexe *Streptococcus thermophilus* RAR1 - ZEN comme modèle d'étude.

La ZEN a été choisie car nos résultats indiquent que sa séquestration par les bactéries fermentaires est quantitativement plus élevée que celle du DON et de la FB_1. Comme pour les autres mycotoxines, les ruminants sont considérés comme plus résistants à la ZEN que les animaux monogastriques. Cependant, sa présence fréquente dans l'herbe (Towers et Sprosen 1993; Engels et Kraemer 1996; Smith et Morris 2006) et l'ensilage de maïs (Oldenburg *et al.* 1996; Seeling et Danicke 2005) ainsi que les désordres qui peuvent lui être associés ne sont pas négligeables (Mirocha *et al.* 1981; Placinta *et al.* 1999; Creppy 2002). En revanche, le porc est nettement plus sensible aux effets de la ZEN, notamment les femelles prépubères chez lesquelles des signes cliniques peuvent être observés à partir de 1 ppm dans la ration (Rainey *et al.* 1990). Dans les conditions du criblage, la souche *Streptococcus thermophilus* RAR1 (Laboratoire de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, LGMPA, INRA Thivernal-Grignon) a été la plus efficace en séquestrant 49% de ZEN (sans la biotransformer).

La simulation d'un cycle de fermentation ruminale par incubation du jus de rumen *ex vivo* en conditions contrôlées (anaérobiose, température, agitation) a été réalisée dans les conditions habituellement utilisées dans notre laboratoire qui bénéficie d'une bonne maîtrise de cette technique. Les conditions physico-chimiques des compartiments post-ruminaux du TGI des ruminants ont été choisies sur la base de simulations décrites dans la littérature (Ward et Spears 1993; Calsamiglia et Stern 1995; Morgavi *et al.* 2001). Les paramètres fixés étaient la concentration des solutés (pepsine, lysozyme, pancréatine et bile bovine), le pH, la température et le temps d'incubation.

Comme les conditions physico-chimiques de l'estomac et de l'intestin grêle du porc sont proches de celles de l'abomasum et de l'intestin grêle des ruminants, respectivement

(Boisen et Fernandez 1997), les essais de stabilité dans les solutions de pepsine et pancréatine peuvent être interprétés pour les deux espèces animales.

2. Expérimentation

2.1 Protocole expérimental

Etude de la stabilité du complexe Streptococcus thermophilus RAR1 – zéaralénone dans le jus de rumen et dans un environnement simulant le tractus gastrointestinal des ruminants in vitro (**annexe 11**)

2.2 Article - Stability of the zearalenone–*Streptococcus thermophilus* complex in ruminal fluid and in simulated gastrointestinal environment *in vitro*

Stability of the zearalenone–*Streptococcus thermophilus* complex in ruminal fluid and in simulated gastrointestinal environment *in vitro*

V. Niderkorn[a, b], H. Boudra[a], D.P. Morgavi[a]

[a] INRA, Herbivore Research Unit, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France

[b]Lallemand S.A.S, 19, rue des briquetiers, B.P. 59, F-31702 Blagnac, France

Running headline: Stability of bound zearalenone in ruminal fluid and in artificial gastrointestinal juices

Key Words: zearalenone, mycotoxin, *Streptococcus thermophilus*, ruminal fluid, binding, stability

ABSTRACT

Fusarium toxin zearalenone (ZEN) is an estrogenic plant contaminant regularly present in feeds. Lactic acid bacteria (LAB) are capable to bind ZEN and this property could be used to limit its toxicity on farm animals. The aim of this work was to examine the stability of the *Streptococcus thermophilus* RAR1–ZEN complex in ruminal fluid (RF) and in conditions simulating compartments of the gastrointestinal tract (GIT). The LAB–ZEN complex was 70% stable in RF up to 18 h incubations, and about 50% of ZEN initially complexed still remained bound after incubation in pepsin, lysozyme, pancreatin and bile either alone or sequentially. However, the release of ZEN was predominantly caused by washing, except for bile that produced a partial dissociation of the complex ($P < 0.05$). Addition of free ZEN to RF resulted in instantaneous binding of about 70% of the toxin. ZEN bound to RF was stable in *in vitro* ruminal fermentations and in simulated GIT juices. It was concluded that complexation of ZEN in RF could contribute to protect ruminants against the toxin, and that the use of selected strains of LAB efficiently binding ZEN to limit its toxic effects could be more advantageous in monogastric animals.

Zearalenone (ZEN), a nonsteroidal estrogenic toxin produced by several *Fusarium* species such as *F. graminearum* and *F. culmorum*, is a common contaminant of cereal grains and forages. In the field, ZEN contamination is highly dependent of climatic conditions, thus its absence in the ration of farm animals cannot be fully assured. The occurrence of ZEN in animal feeds, particularly in corn-based products but also in hay and grass, was reported by several authors [reviewed by (Scudamore et Livesey 1998; Seeling et Danicke 2005)]. ZEN leads to animal reproductive disorders by activation of estrogen receptors. Pigs appear to be most susceptible to the toxic effects of ZEN, while ruminants are considered more resistant (D'Mello *et al.* 1999). However, cases of toxic effects on ruminants has been reported (Seeling et Danicke 2005). Practical, specific and not expensive methods to decontaminate affected feeds are currently not available. For fermented feeds like silage, a possible approach is the use of selected strains of lactic acid bacteria (LAB), which can bind ZEN decreasing its absorption in the gastrointestinal tract (GIT) and hence its toxic effects. The ability of two probiotic strains *Lactobacillus* probiotic strains to bind ZEN and α ZOL *in vitro* was reported (El-Nezami *et al.* 2002). In a previous study, we screened a large number of strains for their ability to bind *Fusarium* toxin in acidified corn infusion, and showed that binding of ZEN is a common property of LAB (unpublished data). Some strains of *Streptococcus* appeared to be particularly efficient. In ruminants, the high density of ruminal microorganisms also could bind ZEN *in situ* in addition to their know role in partial metabolization (Kiessling *et al.* 1984). However, to our knowledge, no data was reported on the binding of mycotoxins in the rumen. In any case, reduction of ZEN toxicity as a consequence of binding will operate only if the complex microorganism-mycotoxin remains stable in the GIT of animals. The aim of the present work was to evaluate the stability of a bacterium, *Streptococcus thermophilus* RAR1–ZEN complex in ruminal fluid (RF) and in conditions simulating the physico-chemical environment of the GIT. Binding of ZEN in RF and stability of the complex formed was also investigated.

The bacterium *Streptococcus thermophilus* RAR1 (LAB collection of the Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA, Thivernal-Grignon, France), previously selected for its efficiency to bind ZEN *in vitro*, was used in this study. ZEN and derivatives α and β zearalenols (α and β ZOL), pepsin, lysozyme from chicken egg white, pancreatin and bovine bile were purchased from Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany. To prepare the mycotoxin solution used for the formation of the bacterium–ZEN complex, ZEN was dissolved in methanol and concentration was determined by measuring

the absorbance at 274 nm (ε = 13,909 M^{-1} cm^{-1}). The methanol was evaporated with nitrogen gas, then the mycotoxin was redissolved in a small volume of ethanol, and 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 4 was added to reach a concentration of 5 mg ZEN/ml. Ethanol represented 1.25% (v/v) of the final mycotoxin solution. The bacterium-mycotoxin complex was prepared as follows: *Streptococcus thermophilus* RAR1 was grown at 37°C for 24 h in M17 broth (Oxoïd Ltd, Basing-stoke, UK) containing 5% v/v of a 10% w/v lactose solution. Bacterial concentration was estimated by measuring the absorbance at 600 nm as described previously (Niderkorn *et al*. 2006). Cells were harvested by centrifugation at 3,000 *g* for 10 min at 5°C, and the bacterial pellet was washed twice with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4). Bacteria (5×10^8 CFU/ml) were resuspended in mycotoxin solution, and the mixture was incubated at 25°C for 1 h with shaking (480 rpm). At the end of the incubation period, tubes were centrifuged (3,000 *g* for 10 min at 5 °C). A control containing no bacteria was included to determine the fraction of ZEN initially bound to bacteria. In a first experiment, the *Streptococcus thermophilus* RAR1–ZEN complex was incubated anaerobically for up to 18 h in 5 ml of sheep's filtered RF buffer solution (Goering et Van Soest 1970) mixed in a 1 to 3 ratio, with and without ground vegetal substrate (50% corn grain, 50% alfalfa hay). Incubations containing free (unbound) ZEN were used as controls. In a second experiment, free ZEN (5 µg/ml) was allowed to bind the particulate fraction of filtered RF with substrate for 1 h at 39°C. The bound ZEN (RF–ZEN complex) was then collected by centrifugation and sequentially incubated in pepsin followed by a mixture of pancreatin and bovine bile, as described below. To discriminate between the biological and a washing effect of these incubations, the complex was also incubated successively in the same buffer used for complexation. In a third experiment, the *Streptococcus thermophilus* RAR1–ZEN complex was incubated for 1 h in pepsin (1 g/l 0.2 M glycine-HCl buffer pH 2.5) or lysozyme (3,000 U/ml 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 6, lysozyme from chicken egg white was used as a replacement of ruminant's stomach lysozyme which is commercially unavailable), and for 2 h in pancreatin or bovine bile (3 g/l 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 7, each). The complex was also incubated sequentially in pepsin followed by the mixture of pancreatin and bovine bile. The washing effect was also investigated for these assays. All assays and controls were carried out in triplicate. Incubation conditions (enzymes and extracts concentration, pH, incubation time, and temperature = 39°C) were chosen to mimic physico-chemical conditions and passage rate in stomach and small intestine. Following the corresponding incubation period, tubes were centrifuged and ZEN was quantified by reversed-phase HPLC in supernatants and bacterial pellets. ZEN was extracted from bacterial

Table 1. Stability of *Streptococcus thermophilus* RAR1–zearalenone complex in ruminal fluid

	RF + substrate + ZEN		RF without substrate + complex		RF + substrate + complex	
Incubation time (h)[a]	0	18	0	18	0	18
Free fraction (%)						
ZEN	24 ± 2	24 ± 3	10 ± 1	45 ± 4	5 ± 0	22 ± 6
α ZOL	nd	5 ± 1	nd	7 ± 2	nd	5 ± 2
β ZOL	nd	4 ± 2	nd	nd	nd	nd
Total	24 ± 2	33 ± 3 *,z	10 ± 1	52 ± 3 *,y	5 ± 0	27 ± 4 *,z
Bound fraction (%)						
ZEN	73 ± 2	52 ± 7	83 ± 5	36 ± 1	91 ± 4	48 ± 4
α ZOL	nd	10 ± 0	nd	6 ± 0	nd	9 ± 0
β ZOL	nd	7 ± 2	nd	4 ± 1	nd	10 ± 0
Total	73 ± 2	69 ± 6 y	83 ± 5	46 ± 1 *,z	91 ± 4	67 ± 4 *,y
Recovery (%)	97	102	93	98	96	94

Free and bound fractions of zearalenone (ZEN) and metabolites α and β zearalenols (α and β ZOL) were percentages found in supernatants and pellets, respectively, from the amount of ZEN initially added; RF = ruminal fluid; nd = not detected. Data are means ± standard deviations of triplicate tubes. Within a row, for a same treatment, total values at 18 h incubation followed by * are significantly different of total values at 0 h incubation ($P < 0.05$). Within a row, total values at 18 h incubation followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

[a] For incubation time = 0, samples were homogeneised and immediately centrifuged .

Table 2. Stability of ruminal fluid–zearalenone complex in solutions simulating post-ruminal compartments of ruminant's gastrointestinal tract

RF–ZEN complex incubation	ZEN released (%)	ZEN remaining bound (%)	Recovery (%)
Abomasum			
Pepsin (pH 2,5; 1h)	5 ± 0 *	94 ± 3	99
Buffer (1h)	8 ± 1	95 ± 4	103
Sequential incubations [a]			
Pepsin followed by pancreatin/bovine bile	9 ± 2 *	90 ± 6	104
Buffer followed by buffer	5 ± 0	86 ± 5	99

Fractions of zearalenone (ZEN) released and remaining bound were percentages found in supernatants and pellets, respectively, from the amount of mycotoxin initially bound to pellet from ruminal fluid (RF). Data are means ± standard deviations of triplicate tubes. Within a column, for a same treatment, means followed by * are significantly different ($P < 0.05$).

[a] Data are fractions of ZEN released and remaining bound after the second incubation period; recovery is the sum of both values and the fraction released after the first incubation period

and RF pellets with methanol. The extraction recoveries were 98% and 96%, respectively. The HPLC system consisted of a P1000XR pump (SpectraSYSTEM, San Jose, California, USA) and an automatic sampler (SpectraPhysics, San Jose, California, USA). Separation of ZEN and derivatives was performed on a C_{18} reversed-phase column (Bischoff, 125 × 4.6 mm, Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm, Leonberg, Germany), using an isocratic mobile phase (methanol-acetic acid 1%-acetonitrile solution, 45:45:10 v/v/v) at a flow rate of 1 ml/min. Detection was detected by photo-diode-array (scan 200-380 nm) and fluorescence (λ_{exc} = 274 nm, λ_{em} = 440 nm) placed in series. Under these conditions, the retention times of ZEN, α and β ZOL were 24.2, 19.9 and 12.1 min, respectively. Data was subjected to the analysis of variance (ANOVA). A significant difference ($P < 0.05$) between means was determined by Duncan's multiple range test in the first experiment and Dunett's test in the second and third experiments, using the Statistical Analysis System software package (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Fractions of ZEN bound to *Streptococcus thermophilus* RAR1 before incubation in RF and solutions simulating GIT were 59 ± 2 % and 51 ± 3 %, respectively. These values are within normal ranges (Niderkorn *et al.* 2006). Immediately after mixing free ZEN and RF followed by centrifugation, 73% of ZEN added was found in pellet, indicating that ZEN was instantaneously bound even without added probiotic bacteria (table 1). The bound to free mycotoxin ratio did not change at the end of the 18 h incubation ($P > 0.05$). When ZEN was added bound to bacteria to rumen incubations in presence of vegetal substrate, more than 90% remained in the complex at 0 h. However, at 18 h, the bound to free mycotoxins ratio was similar to that obtained with free ZEN ($P > 0.05$). In contrast, in the absence of substrate, the bound fraction drastically decreased following incubation ($P < 0.05$). Independently of treatments, a fraction of ZEN was metabolized to α and β ZOL, and these metabolites were found in both the free and bound fractions. In the second experiment, the stability of the RF–ZEN complex was tested *in vitro* in simulated gastric and intestinal environments. The fraction of ZEN bound in this experiment was 71 ± 4% and the complex was stable after incubating in pepsin alone and after a sequential incubation in pepsin followed by the mixture of pancreatin and bovine bile (table 2). As RF-ZEN, the *Streptococcus thermophilus* RAR1–ZEN complex was also stable in solutions of pepsin, lysozyme or pancreatin, between 65% and 77% of ZEN remained bound after incubation (table 3). These percentages were similar to those observed in buffer ($P > 0.05$), indicating that the proportion of ZEN dissociated was due to washing rather than to a chemical effect of these digestive substances. In contrast, ZEN

Table 3. Stability of *Streptococcus thermophilus* RAR1–zearalenone complex in solutions simulating post-ruminal compartments of ruminant's gastrointestinal tract

St. thermophilus RAR1 –ZEN complex incubation	ZEN released (%)	ZEN remaining bound (%)	Recovery (%)
Abomasum			
Pepsin (pH 2,5; 1h)	16 ± 0 *	77 ± 7	93
Lysozyme (pH 6; 1h)	32 ± 2	77 ± 5	109
Buffer (1h)	29 ± 3	69 ± 5	98
Small intestine			
Pancreatin (pH 7; 2h)	27 ± 4	65 ± 5	92
Bovine bile (pH 7; 2h)	52 ± 7 *	51 ± 2 *	103
Buffer (2h)	28 ± 5	73 ± 5	101
Sequential incubations [a]			
Pepsin followed by pancreatin/bovine bile	37 ± 6 *	48 ± 5	101
Buffer followed by buffer	24 ± 5	45 ± 7	98

Fractions of zearalenone (ZEN) released and remaining bound were percentages found in supernatants and pellets, respectively, from the amount of mycotoxin initially bound to bacteria. Data are means ± standard deviations of triplicate tubes. Within a column, for a same treatment, means followed by * are significantly different of incubation in buffer ($P < 0.05$).

[a] Data are the same of those shown in table 2.

release was more important in bovine bile than in other solutions including buffer ($P < 0.05$), suggesting that bile had a negative effect on the complex stability. Sequential incubations in buffer alone or in pepsin followed by the mixture of pancreatin and bovine bile resulted in a further release of ZEN. In both cases, percentage of ZEN remaining bound after the second incubation period was about 50% of the initial amount. In all experiments, recoveries of free and bound fractions were close to 100%, indicating that ZEN or metabolites were not further transformed.

The ability of LAB to bind ZEN was reported in buffer and culture medium by El-Nezami *et al.* (2002), which observed this property at high bacterial densities. Niderkorn *et al.* (2006) also showed binding of ZEN by LAB at lower bacterial concentrations in conditions simulating corn silage in term of substrate and pH. The use of selected strains could decrease the absorption of ZEN in farm animals consuming contaminated fermented feeds, and consequently limit its toxic effects. However, the stability of the bacterium–ZEN complex in the GIT is essential for the practical use of this technology. In this work, we showed that about 70% of free ZEN is rapidly bound to the particulate matter present in RF. This observation may be explained by the high density of microorganisms including LAB in RF, although it has to be noted that the role of small feed particles could not be quantified in this work. The instantaneous complexation is consistent with previous studies on binding of ZEN and other compounds by LAB (Morotomi et Mutai 1986; El-Nezami *et al.* 2002). The RF–ZEN complex remained stable in rumen fluid up to 18 h, but also after incubation in solutions simulating post-ruminal compartments of the GIT. After incubation of ZEN bound to *Streptococcus thermophilus* RAR1 in RF, the proportion of ZEN remaining bound did not change in presence of substrate, but it decreased in the absence of substrate. Substrate can play a positive role on complexation either by increasing the bacterial biomass or directly by binding a fraction of ZEN. In absence of substrate, bacterial lysis and competition among ruminal microorganisms could also result in a partial release of ZEN. The metabolization of ZEN to α and β ZOL by ruminal microflora is well-known (Kiessling *et al.* 1984) and our results are consistent with this observation. In addition, we showed that a fraction of metabolites was also bound by RF. Little data are available about the kinetic of ZEN in ruminants, some studies reported that only negligible levels of ZEN and its metabolites were found in plasma and tissues of dairy cows fed high oral doses of this mycotoxin (Prelusky *et al.* 1990; Kleinova *et al.* 2002). According to the results of the present work, binding of ZEN by RF could contribute to this low absorption. The tolerance of ruminants to ZEN has been

explained by a high efficiency in the biotransformation and elimination of ZEN by the liver as compared to pigs and also by ZEN metabolization by rumen microbes. This work also suggests that a decrease in mycotoxin bioavailibility due to binding could be a contributing factor to ruminants' tolerance to ZEN. The use of selected LAB capable to bind ZEN seems not to give any particular benefit to ruminants. However, this property could be more advantageous in monogastric animals such as pigs, which can be fed fermented cereal grains. In the present study, no effect of pepsin, lysozyme or pancreatin was observed on the stability of the *Streptococcus thermophilus* RAR1–ZEN complex, since the released fraction observed was similar in buffer. The abomasum of ruminants has the particularity to produce lysozyme. This enzyme was tested because its hydrolytic action against gram positive bacteria could have an effect on the LAB–ZEN complex stability. In contrast, the higher release of ZEN in bile in comparison to buffer incubation indicates that bile can partially dissociate the complex. If this observation also occurs *in vivo*, a fraction of ZEN bound to bacteria could be released in the small intestine. The effect of bile was also shown when the complex was sequentially incubated in pepsin followed by the mixture of pancreatin and bile. However, a similar release of ZEN was also observed with sequential incubations in buffer, indicating that washing remained the main cause of release. The washing effect observed is consistent with results of a previous study indicating a limited release after repeated washes of viable *Lactobacillus*–ZEN complex with water (El-Nezami *et al.* 2004). In our *in vitro* experiments, about 50% of ZEN initially complexed to bacteria remained stable under conditions simulating the GIT of animals. However, *in vivo* experiments are needed to evaluate the biological importance of ZEN binding by selected strains of LAB.

Acknowledgments

V. Niderkorn is the recipient of a CIFRE Lallemand SAS research fellowship.

The authors are thankful to the Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA Thivernal-Grignon, France, for providing the strain of LAB. They also thank Henri Durand and Frederique Chaucheyras-Durand for the scientific assistance in this project.

References

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M. and Macdonald, A.M.C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**, 183-205.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2004) Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4577-4581.

El-Nezami, H.S., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3545-3549.

Goering, H.K. and Van Soest, P.J. (1970) Forage Fiber Analyses (apparatus, reagents, procedures, and Some Applications). In *ARS-USDA Handbook n°379* ed. Office, U.G.P. Washington, DC,

Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K. and Olsen, M. (1984) Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1070-1073.

Kleinova, M., Zollner, P., Kahlbacher, H., Hochsteiner, W. and Lindner, W. (2002) Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4769-4776.

Morotomi, M. and Mutai, M. (1986) *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**, 195-201.

Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D.P. (2006) Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 849-856.

Prelusky, D.B., Scott, P.M., Trenholm, H.L. and Lawrence, G.A. (1990) Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B* **25**, 87-103.

Scudamore, K.A. and Livesey, C.T. (1998) Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* **77**, 1-17.

Seeling, K. and Danicke, S. (2005) Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition. A review. *J. Anim. Feed Sci.* **14**, 3-40.

III. MECANISME DE SEQUESTRATION DES FUMONISINES

Les résultats du criblage de souches ont montré que la séquestration des fusariotoxines est un phénomène répandu chez les bactéries fermentaires. Cependant, le taux de séquestration varie avec le genre bactérien mais aussi avec les fusariotoxines. Quelle(s) différence(s) structurale(s) au niveau de la paroi bactérienne pourraient expliquer ces différences ? La réponse à cette question, et d'une manière plus générale, l'amélioration des connaissances sur le déterminisme de la formation et de la stabilité des complexes bactérie-mycotoxines, pourraient à terme permettre de sélectionner des souches particulièrement efficaces sur la base des constituants pariétaux impliqués dans ce mécanisme.

Au-delà de l'objectif de sélection, ces essais peuvent contribuer à la compréhension des interactions bactéries–fusariotoxines dans divers environnements où elles peuvent être en contact comme les ensilages, les céréales fermentées destinées à la nutrition humaine et animale, et le TGI.

La séquestration des différentes mycotoxines testées à ce jour (AFB_1, ZEN, trichothécènes, fumonisines, OTA) présente de nombreuses caractéristiques communes : i) la séquestration est rapide, ii) les traitements thermiques et acides qui « décapent » la surface bactérienne augmentent significativement le taux de séquestration, suggérant que les sites de séquestration sont ancrés dans la paroi plutôt que situés en surface, iii) les traitements chimiques et enzymatiques des bactéries inhibent partiellement ou pas du tout la séquestration, iv) une concentration bactérienne minimale d'environ 10^8-10^9 UFC/ml est nécessaire, v) des quantités élevées de mycotoxines peuvent être séquestrées sans que les sites de fixation ne soient saturés (El-Nezami *et al.* 2004; Gratz *et al.* 2004). Par conséquent, le constituant pariétal impliqué dans le mécanisme de séquestration des différentes mycotoxines pourrait être semblable.

1. Choix des fumonisines B_1 et B_2 comme fusariotoxines d'étude

Nous avons choisi d'étudier le mécanisme de séquestation des fumonisines B_1 et B_2 qui est original sur certains points. D'une part, la séquestration des fumonisines opère essentiellement à pH acide, et d'autre part nous avons observé que la légère différence structurale des deux fumonisines (un groupement OH en C_{10} chez la FB_1, absent chez la FB_2) (**figure 1**) affecte de façon importante leur taux de séquestration (FB_2 > FB_1). Cette observation suggère que le niveau de séquestration des différents composés d'une famille de

mycotoxine pourrait varier significativement, pouvant contribuer à des différences de biodisponibilité. Dans ce cadre, l'étude du mécanisme de séquestration de la FB_1 et de la FB_2 peut apporter des informations supplémentaires.

De plus, les fumonisines suscitent un fort intérêt depuis que des études épidémiologiques ont démontré que l'exposition humaine à ces fusariotoxines pouvait entraîner des cancers de l'œsophage (IARC 1993). Chez les animaux domestiques, l'œdème pulmonaire chez le porc et la leucoencéphalomacie chez les équidés sont les principales mycotoxicoses dues aux fumonisines. Il semble également que l'exposition chronique à ces fusariotoxines fragiliserait les structures membranaires, affectant le foie et les reins (Riley *et al.* 1998). Ces effets ont conduit la Commission Européenne à recommander des teneurs maximales en fumonisines B_1 et B_2 dans l'alimentation animale (**annexe 13**), législation à laquelle certaines zones géographiques semblent avoir des difficultés à se soumettre (Pasti 2006).

2. Protocole expérimental

Mécanisme de séquestration des fusariotoxines par les bactéries fermentaires. Etude de l'interaction bactérie – fumonisines B_1 et B_2 (**annexe 12**)

Une approche à deux niveaux à été utilisée : i) la détermination du (ou des) constituant(s) de la paroi bactérienne séquestrant les fumonisines. Pour cela, nous avons étudié l'influence sur la séquestration, de traitements physico-chimiques et enzymatiques des bactéries, et de mutations affectant la synthèse de certains composants pariétaux. Des essais de séquestration avec des peptidoglycanes purifiés commerciaux issus de bactéries gram positives ont également été réalisés, ii) la détermination du (ou des) groupement(s) fonctionnel(s) des fumonisines interagissant avec les bactéries. Des essais de séquestration ont été effectués avec des fumonisines dont la fonction amine libre a été masquée ou dont les bras d'acide tricarballylique ont été éliminés par hydrolyse.

Deux souches de bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus* RAR1, LGMPA, INRA Jouy-en-Josas et *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885, CNRS FRE 2326), issues du criblage et présentant des capacité de séquestration des fumonisines relativement

différentes (*S. thermophilus* > *Lb. paraplantarum*), ont été sélectionnées pour la plupart de ces essais.

Enfin, une méthode de modélisation moléculaire *in silico* est proposée pour distinguer les conformations de la FB_1 et de la FB_2 en milieu aqueux et à différents niveaux d'ionisation.

3. Article - Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisins B_1 and B_2 by lactic acid bacteria

Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisins B_1 and B_2 by lactic acid bacteria

V. Niderkorn[a,b,*], D.P. Morgavi[a], B. Aboab[c], M. Lemaire[c], H. Boudra[a]

[a] Herbivore Research Unit, French Institute for Agricultural Research (INRA), Clermont-Fd-Theix Research Centre, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France
[b] Lallemand S.A, 19, rue des briquetiers, B.P. 59, F-31702 Blagnac, France
[c] SEESIB, University Blaise Pascal, UMR 6504 CNRS, 24, avenue des Landais, F-63177 Aubiere, France.

Keywords: Fumonisins B_1 and B_2, lactic acid bacteria, peptidoglycan, binding, bioavailability, detoxification; probiotics

ABSTRACT

Fumonisins B_1 and B_2 (FB_1, FB_2) are secondary fungal metabolites toxic to various animal species and humans, which are found in contaminated corn worldwide. The ability of lactic acid bacteria (LAB) to bind FB in fermented food and feed, and in the gastrointestinal tract (GIT) could contribute to decrease their bioavailability and toxicity. The aim of this study was to identify the bacterial cell wall component and the functional groups of FB involved in the LAB-FB interaction. The effect of physicochemical, enzymatic and genetic treatments of bacteria, and the effect of removal/inactivation of the functional groups of FB on toxin binding were estimated. We showed that peptidoglycan (PG) is likely the binding site of FB since physicochemical treatments exposing this cell wall component increased the bound fraction, while lysozyme and mutanolysin, enzymes that target the PG structure, partially inhibited it. In addition, purified PG from Gram positive bacteria bound FB in a manner analogue to that of viable LAB. For FB, tricarballylic acid (TCA) chains play a significant role in binding as hydrolysed FB had less affinity for LAB. On the other hand, the free amine group inactivation had no negative effect on binding. The large difference in normally binding observed with these two FB analogues (FB_2>FB_1) was elucidated by molecular modeling that showed that the additional hydroxyl group in FB_1 form a hydrogen bond with one TCA, resulting in a spatial configuration where the TCA is less available to interact with the bacterial PG. Taken together, these results help to explain the reason of the widespread binding of mycotoxins by LAB. Understanding the differences among bacterial PG types of LAB will allow to preselect LAB species as potential probiotics for reducing the toxicity of FB in exposed farm animals and humans.

1. Introduction

Fumonisins, a structurally related mycotoxin group chiefly produced by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*, are common contaminants of corn and corn-based products worldwide [1, 2]. The main analogues found in naturally contaminated crops are fumonisin B_1 (FB_1) and, to a lesser extent, fumonisin B_2 (FB_2). FB_1 is the diester of propane-1,2,3-tricarboxylic acid (tricarballylic acid, TCA) and 2*S*-amino-12*S*,16*R*-dimethyl-*3S*,5*R*,10*R*,14*S*,*15R*-pentahydroxyeicosane, in which the C_{14} and C_{15} hydroxyl groups are esterified with the terminal carboxyl group of TCA. FB_2 is the C_{10} deoxy analogue of FB_1, in which the corresponding stereogenic units on the eicosane backbone have the same configuration (Fig. 1).

FB_1 and FB_2 are phytotoxic to corn [3], cytotoxic to various mammalian cell lines [4] and possess cancer-initiating properties [5]. The occurrence of these analogues in home-grown corn has been epidemiologically linked with an increased risk of oesophageal cancer in humans in some regions such as the Transkei region of South Africa [6, 7], Northern Italy [8], Iran [9] and China [10]. Thus, FB_1 and FB_2 are considered possible carcinogens to human and classified as class 2B (IARC, 1993) [11]. These mycotoxins have also been associated with diseases in domestic animals, such as equine leukoencephalomacia [12, 13], pulmonary edema, hydrothorax and cardiovascular disturbances in pigs [14, 15], and nephrotoxic, hepatotoxic and immunosupressing effects in various animal species. The toxicological profile of fumonisin B group of mycotoxins (FB) is very similar [16]. The mechanism of action appears to involve disruption of sphingolipid biosynthesis by the inhibition of the enzyme sphingosine *N*-acetyltransferase (ceramide synthase) [17, 18], modification of cellular proliferation through changes in cell cycle regulators [19, 20], and increased expression of cytokines such as tumor necrosis factor α [21]. FB are more toxic *in vivo* than their hydrolyzed or *N*-acetylated counterparts. The free amino group appears to play a specific role in the biological activity of fumonisins [5].

In spite of their toxicity, studies on the toxicokinetics of FB_1 and FB_2 indicate that they are absorbed very poorly when administered orally in a variety of animal species, resulting in what Shier [22] called the “fumonisin paradox”. FB_1 bioavailability appears to be minor bioavailable in rat [23-25], pig [26], laying hens [27] and vervet monkey [28], and negligible in cow [29]. FB_1 is rapidly eliminated from plasma via the bile, and almost all ingested toxin is excreted in faeces, mainly as the unmetabolized form. Toxicokinetic studies of FB_2 have shown that it may be even less bioavailable than FB_1 in rat [30] and vervet monkey [31], although a large orally single dose of FB_2 can cause transient disruption of sphingoid

metabolism in monkey [32]. These authors have attributed the poor absorption of FB to poor transport across the mucosa of the gut or to the strong association with the contents of the gut.

Even though the amount of toxin absorbed is low, binding of FB by lactic acid bacteria (LAB) from fermented food and feed, and present in the gastrointestinal tract (GIT) could further contribute to decrease the toxin bioavailability. This property could also decrease the exposure of intestinal mucosa to FB. Gut tissues exposed to FB have a diminished immune response, and an altered proliferation and barrier function of mucosal cells leading to an increased colonization by pathogenic *Escherichia coli*. [33, 34]. Viable and nonviable LAB are capable to bind FB_1 and FB_2 in a pH, genus, bacterial density and analogue (FB_2>FB_1) dependent manner *in vitro* [35]. Binding is rapidly effective (< 1h) in acidic conditions, forming a complex stable in the range of pH present in the GIT. This activity is probably present in a variety of fermented food and feed such as silage [36] or fermented corn meal [37], but might also operate in the stomach. Similar binding of other major mycotoxins aflatoxin B_1 (AFB_1) [38], zearalenone [39] and certain trichothecenes [40] by some probiotic LAB has also been shown *in vitro*. It was reported that binding of AFB_1 by these strains can reduce their adhesion capability to intestinal mucosa [41, 42] and mycotoxin exposure *in vivo* [43, 44]. In the absence of a simple detoxification method of food and feed contaminated by FB, the use of selected strains of LAB appears as a promising approach to reduce their toxicological effects. However, an understanding of the binding mechanism is required to allow the optimization and safe dietary application of this biological activity.

This work attempts to identify the component of the bacterial cell wall and the chemical group of FB involved in the mechanism of binding. In addition, the three-dimensional conformations of FB_1 and FB_2 were investigated using a molecular modeling approach to explain their different binding behavior.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial materials

Strains *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885 (CNRS, FRE2326 Strasbourg, France) and *Streptococcus thermophilus* RAR1 (LAB collection of the Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA, Thivernal-Grignon, France) were used in most experiments. *S. thermophilus* CNRZ 1066 and its non-capsular, non-exopolysaccharide (EPS) producing mutant *S. thermophilus* JIM 8752 were obtained from the Microbial Genetics Unit, INRA, Jouy-en-Josas, France. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 and mutants, in which the synthesis of certain cell wall components and adhesion properties are affected, were

from the Dairy Research and Applied Genetics Unit, INRA, Jouy-en-Josas, France. Bacterial strains were grown at optimal temperature (30°C or 37°C) in De Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS) for Lactobacilli, and M17 broth (Oxoïd Ltd., Basingstoke, UK), supplemented with 0.5% of glucose for Lactococci, or 10% of lactose for Streptococci. Commercial purified peptidoglycans (PG) from Gram-positive bacteria *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* were purchased from Sigma, Steinheim, Germany.

2.2 Fumonisins and aminopentols

FB_1 and FB_2 were purchased from Sigma (Steinheim, Germany) and Promec (Tygerberg, South Africa), respectively, and dissolved in an exact volume of acetonitrile-water in the ratio 1:1 (v/v) to achieve the desired concentration of stock solutions. Total hydrolysis of FB_1 and FB_2 leading to aminopentols (HFB_1 and HFB_2), respectively, were obtained according to Pagliuca *et al.* [45].

2.3 Physicochemical and enzymatic treatments of bacteria

Firstly, the effect of freezing of bacteria (-18°C) on binding was tested to check if the binding ability was not negatively affected by this mode of conservation. For experiments, bacteria (*L. paraplantarum* CNRZ 1885 and *S. thermophilus* RAR1) were thawed at room temperature, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) 0,01M, pH 7.4, and treated by one of the following methods: water (25°C or 100°C, 15 min), HCl 1M (100°C, 15 min), sodium dodecyl sulphate (SDS, 2%, w/v, 100°C, 15 min), or trichloracetic acid (10%, w/v, 100°C, 15 min). After treating, suspensions were centrifuged (3000 *g*, 10 min., 5°C). For enzymatic treatments, washed bacteria were resuspended in 1 ml lysozyme (Sigma, 45,000 U/ml in phosphate buffer, pH 6), mutanolysin (Sigma, 50,000 U/ml in phosphate buffer, pH 6), pronase E (Sigma, 1 mg/ml in PBS 0,01M, pH 7.4), lipase (Sigma, 1 mg/ml in PBS 0,01M, pH 7.4) or trypsin (Sigma, 1 mg/ml, Tris-HCl buffer, pH 8, 10 mM $CaCl_2$). A non-treated control was added. Enzyme treated suspensions were incubated at 37°C for 2 h with shaking (240 rpm), and centrifuged (12,000 *g*, 10 min., 5°C). All the residues were washed three times with 4 ml PBS and used for the binding assay. All experiments were performed in triplicate.

2.4 In vitro binding assay

Treated and non-treated bacteria (10^9 CFU or 10^{10} CFU for certain experiments, see footnotes of tables) or PG (0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mg/ml) were suspended in 1 ml of corn

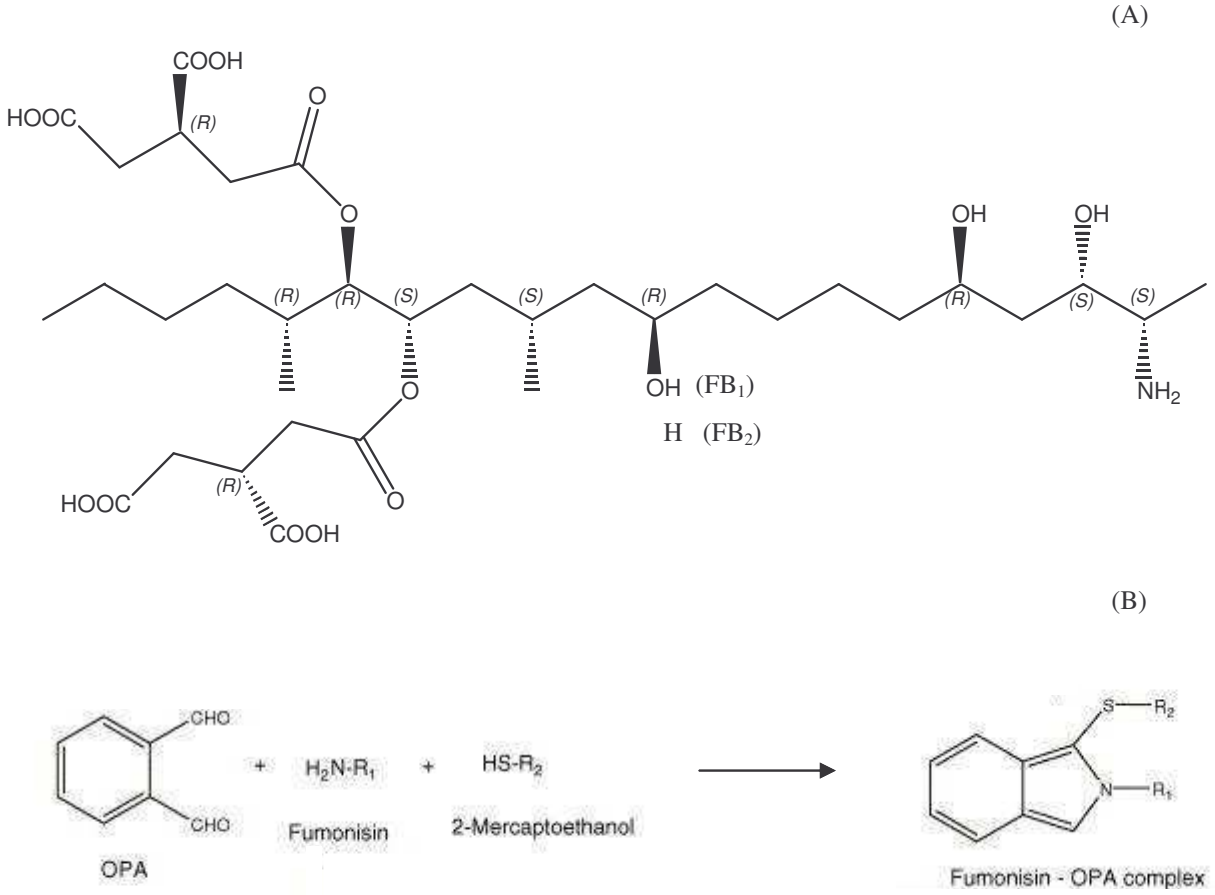


Fig. 1. (A) Absolute configuration of FB_1 and FB_2 and (B) formation of the fumonisin- *ortho*-phthalaldehyde (FB-OPA) complex.

infusion adjusted to pH 4 with lactic acid, prepared as previously described [35], and containing FB_1 and FB_2 (5 µg/ml each). Binding assays with non-treated bacteria incubated in acidified corn infusion supplemented with NaCl (0, 0.1M, 0,5M) or $CaCl_2$ (0, 0.1M, 0,5M), and binding assays of HFB_1 and HFB_2 were also performed. For each experiment, positive controls containing no bacterial material and a negative control containing no toxin were included. Assays and controls were incubated at 25°C for 1 h and centrifuged (3000 *g*, 10 min, 5°C). Supernatants and bacterial pellets were analysed for fumonisins by reversed-phase HPLC to determine free and bound fractions, respectively. An optimized procedure was used to compare binding of intact FB and FB in which the free amine was inactivated by complexation with *ortho*-phthalaldehyde (OPA) (Fig. 1). Due to the instability of the FB-OPA complex [46], assays were performed respecting an exact timing as follows: At t = 0, a pure FB solution (800 µg/ml) and reagent with (or without) OPA were mixed (1:1 v/v). At t = 2 min, 50 µl of this mixture was mixed to 950 µl of acidified corn infusion containing bacteria (10^{10} CFU/ml), then incubated for 9.25 min at 25°C. At t = 12 min, tubes were centrifuged (4500 *g*, 3 min, 4°C). At t = 20 min, supernatants containing intact FB were derivatized with OPA. All samples were injected at t = 22 min. For this experiment, pellets were not analyzed. All assays and positive controls were performed in triplicate.

2.5 HPLC analysis

The HPLC system consisted of a GOLD 126 solvent module (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA), an automatic sampler (Spectra-Physics, San Jose, California, USA) equipped with a 100 µl loop, and a fluorescence detector FL3000 (Spectra-System, San Jose, California, USA). Separation of FB and HFB was performed at room temperature on a C_{18} reversed-phase column (Prontosil, 150 × 4.6 mm, 3 µm, Bishoff Chromatography). Fumonisins were derivatized before injection using OPA. Bacterial pellet extraction was completed adding 1 ml acetonitrile-water (1:1 v/v) to pellet. This mixture was vigorously vortexed twice for 10 sec, placed in an ultrasonic bath for 6 min, again vortexed for 10 sec, then centrifuged (7000 rpm, 3 min, 5°C). Pellets spiked with 5 µg FB were used as positive controls and identically treated. Supernatants from samples and pellets extracts were 4-fold diluted in acetonitrile-water (1:1 v/v), then 40 µl were added to 60 µl 0.1M borate buffer at pH 10 and 100 µl of OPA reagent were added. The preparation was mixed and allowed to react for 2 min before injection of 20 µl. Separation of FB_1, FB_2, AP_1 and AP_2 was performed with a gradient elution using acetonitrile (A) and water–methanol (1:1 v/v) acidified at pH 3.35 with pure acetic acid (B). The gradient program was as follows: 10% to 60% of solvent

A in 6 min, 60% A for 7 min, and 60% to 10% A in 1 min. The flow rate was 1 ml/min and detection was set at 336 nm excitation and 440 nm emission. The retention times of FB_1, FB_2, HFB_1 and HFB_2 were 9.9, 12.2, 10.2, 13.4 min, respectively. The percentages of free (or bound) mycotoxin were calculated as 100 × [Peak area of mycotoxin in the supernatant (or pellet extract)/ Peak area of mycotoxin in the positive control].

2.6 Statistical Analysis

Data was subjected to the analysis of variance (ANOVA). A significant difference between means of controls and assays ($P<0.05$) was determined by Dunett's test using the Statistical Analysis System software package (SAS Institute Inc., Cary, NC).

2.7 Molecular modeling

Conformational analysis of molecules FB_1 and FB_2 in water solution were performed using Monte-Carlo Multiple Method with AMBER force field and GB/SA solvation model Macromodel 8.0 program (Macromodel 8.0, Shroedinger Inc, 1500 SW First Ave. Suite 1180, Portland, OR 97201, USA). To take account of pKas of fumonisins, conformations were carried out applying ionized states of carboxyl and amine groups. In this case, 4 Na^+ and 1 Cl^- were added in the solution to maintain neutral charge of the molecular system.

3. Results and discussion

The ability of LAB to bind fumonisins could contribute to decrease the bioavailability and toxicity of FB_1 and FB_2 in human and farm animals. The binding activity of LAB could be integrated in the parameters of selection of probiotics and starters used for the acidification of fermented corn meals and corn silage. However, the mechanism of binding is unknown and the LAB-FB interaction need to be better understood to optimise the selection of strains. In this paper, we elucidated the component of the bacterial cell wall and the FB functional groups involved in binding. In addition, we proposed an explanation for the different binding behaviour of FB_1 and FB_2.

3.1 Determination of the bacterial cell wall binding site

The cell wall of lactic acid bacteria has the typical Gram positive structure made of a thick, multilayered PG sacculus in which proteins, teichoic (TA) and lipoteichoic acids (LPA), and polysaccharides are associated [47]. We previously reported that all genera of LAB are capable to bind FB_1 and FB_2 [36] suggesting that the binding site is a component largely

Table 1. Effect of freezing, chemical and enzymatic treatments of bacteria on binding of fumonisins B_1 and B_2 by *Streptococcus thermophilus* RAR1 and *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885

Treatment	FB_1						FB_2					
	S. thermophilus RAR1			*L. paraplantarum* CNRZ 1885			*S. thermophilus* RAR1			*L. paraplantarum* CNRZ 1885		
	free (%)[c]	bound (%)[d]	Recov. (%)	free (%)[c]	bound (%)[d]	Recov. (%)	free (%)[c]	bound (%)[d]	Recov. (%)	free (%)[c]	bound (%)[d]	Recov. (%)
Freezing												
Fresh bacteria (control)	95 ± 3	3 ± 0	98	95 ± 5	2 ± 0	97	64 ± 6	41 ± 3	105	71 ± 0	27 ± 2	98
Defrosted bacteria	93 ± 2	14 ± 1 **	107	93 ± 1	8 ± 0 **	101	41 ± 2 **	51 ± 1 **	92	60 ± 4 **	42 ± 0 **	102
Physicochemical treatments [a]												
Water, room temp., 15 mn	78 ± 5	9 ± 0	87	79 ± 2	9 ± 0	88	30 ± 4	45 ± 1	75	36 ± 5	45 ± 1	81
Water, 100°C, 15 mn (control)	68 ± 3	18 ± 1	86	81 ± 7	15 ± 5	96	21 ± 2	58 ± 2	79	27 ± 6	58 ± 10	85
HCl 1N, 100°C, 15 mn	67 ± 1	24 ± 1 **	91	87 ± 3	7 ± 2	94	19 ± 2	65 ± 2 **	84	35 ± 7	51 ± 7	86
SDS 2% w/v, 100°C, 15 mn	69 ± 7	19 ± 1	88	76 ± 4	12 ± 1	88	19 ± 3	62 ± 2	81	24 ± 1	55 ± 4	79
Trichloracetic acid 10% w/v, 100°C, 15 mn	54 ± 1 **	37 ± 1 **	91	69 ± 3 **	19 ± 4	88	9 ± 2 **	76 ± 2 **	85	20 ± 3	65 ± 8 **	85
Enzymatic treatments [b]												
Without treatment (control)	91 ± 4	14 ± 1	105	93 ± 3	7 ± 1	100	38 ± 1	53 ± 2	91	65 ± 5	43 ± 2	108
Lysozyme, 45000 U/ml	89 ± 3	9 ± 0 *	98	93 ± 4	7 ± 0	100	42 ± 11	41 ± 1 *	83	75 ± 3 *	34 ± 1 *	109
Mutanolysin, 5000 U/ml	92 ± 4	10 ± 1 *	102	99 ± 5	5 ± 1 *	104	51 ± 7 *	42 ± 2 *	93	77 ± 7 *	27 ± 6 *	104
Lipase, 1 mg/ml	88 ± 7	13 ± 1	101	94 ± 4	8 ± 0	102	44 ± 4	52 ± 0	96	70 ± 4	37 ± 3	107
Pronase 1 mg/ml	88 ± 6	15 ± 1	101	97 ± 2	8 ± 0	105	46 ± 6	50 ± 1	96	72 ± 9	36 ± 2	108
Trypsin, 1 mg/ml	86 ± 7	17 ± 1	103	92 ± 1	9 ± 0	101	43 ± 5	53 ± 2	96	64 ± 4	41 ± 2	102

For all experiments, treated or not treated bacteria (10^9 CFU/ml) were incubated in acidified corn infusion containing FB_1 and FB_2 (5 µg/ml each) for 1h at 25°C.

[a,b] Experiments were achieved from thawed bacteria.
[b] Incubations were achieved at 37°C for 2 h.
[c] Free fraction of fumonisins was fraction of toxin remaining in supernatant (vs control without bacteria).
[d] Bound fraction of fumonisin was fraction of toxin in bacterial pellet (vs bacterial pellet contaminated with FB_1 and FB_2, 5 µg each).
Data shown are means and standard deviations of triplicates.
* and ** means that binding of FB by treated bacteria was significantly decreased or increased, respectively ($P<0.05$) compared to control.

conserved in the cell wall of these bacteria. However, variations of the bound fraction of FB observed between genera and species suggest that physiological differences result in dissimilar efficiencies. This component is early synthesized since binding occurs during the latency phase of bacterial growth, even if a maximum is observed at the end of the exponential phase (data not shown).

No physicochemical treatment of bacteria inhibited the binding of FB_1 or FB_2 (Table 1). In this table, some treatments did not have the same statistical value between free and bound fractions. These differences can be attributed to slight variations in the recovery of FB in control and assays or to *P*-values at the limit of the significance. Freezing/thawing and thermal treatments of bacteria increased the bound fractions of FB_1 and FB_2 by both tested strains ($P<0.05$). Among the chemical treatments, trichloracetic acid caused a large increase in bound FB proportion ($P<0.05$). HCl also produced the same effect although it was only significant on *Streptococcus* cells ($P<0.05$). The increase in binding observed with heat- and acid-treated bacteria was also reported for other mycotoxins [39, 40, 48]. It is admitted that these treatments degrade the surface of the cell wall and increase the exposition of binding sites to mycotoxins. The trichloracetic acid treatment to extract PG-associated cell wall polymers from Gram positive bacteria is well established [49]. Our results suggest that the binding site takes place in the subsurface of the cell wall. Since polysaccharides and TA are known targets of HCl and trichloracetic acid [50], and since a *S. thermophilus* non-capsular, not EPS-producer mutant bound as efficiently FB than the wild strain ($P>0.05$) (Table 2), these polymers appear to be not involved in the binding mechanism of FB. Much in the same way, surface proteins are unlikely binding sites for FB because SDS, which causes denaturation of proteins, results in an increase of binding ability, while trypsin and pronase E, an unusually unspecific protease from *Streptomyces griseus*, had no effect on binding ($P>0.05$) (Table 1). Finally, lipase had no effect on binding ($P>0.05$), and the *Lc. Lactis* LTA-defective mutant ΔD bound more FB_1 ($P<0.05$) and as much FB_2 ($P>0.05$) as the wild strain (Table 2), suggesting that LTA doesn't play a role in the mechanism either. Thus, the adhesion properties of bacteria due to the presence of LTA, which are the main components responsible of the hydrophobicity of the cell wall [51], appear not to have any function in FB binding. Lysozyme and mutanolysin were the only treatments which caused a partial but significant inhibition of this activity ($P<0.05$). Taken together, these results indicate that the binding site of FB may be PG or compounds tightly associated to it, as it was suggested for the binding of AFB_1 [52].

Table 2. Effect of mutations affecting exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* or peptidoglycan and lipoteichoic acids biosynthesis in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* on binding of fumonisins B_1 and B_2

Genotype	Protein or function affected	FB_1			FB_2		
		free (%)	bound (%)	Recov. (%)	free (%)	bound (%)	Recov. (%)
Derivative from Streptococcus thermophilus CNRZ 1066							
CNRZ 1066	Wild type (EPS +)	87 ± 0	7 ± 0	94	49 ± 0	53 ± 3	100
JIM 8752	EPS (-)	84 ± 3	7 ± 1	91	44 ± 4	51 ± 1	95
Derivatives from Lactococcus lactis ssp. cremoris MG1363							
MG1363	Wild type	92 ± 6	4 ± 1	96	25 ± 2	65 ± 3	90
ΔacmA	PGN hydrolase (N-acetyl-glucosamidase activity)	94 ± 1	6 ± 1	100	23 ± 1	70 ± 3	93
ponA -	PBP 1A (mutation increases adhesion)	97 ± 1	5 ± 0	102	25 ± 2	62 ± 6	87
pbp 2A -	PBP 2A (PGN transpeptidase)	94 ± 1	4 ± 1	98	48 ± 8 *	47 ± 1 *	95
pbp 2B -	PBP 2B (PGN transpeptidase)	95 ± 5	5 ± 0	100	52 ± 6 *	45 ± 3 *	97
ΔD	LTA synthesis	88 ± 1 **	11 ± 1 **	99	30 ± 0	69 ± 4	99

Bacteria (10^9 ufc/ml for Streptococci, 10^{10} ufc/ml for Lactococci) were incubated in corn infusion containing FB_1 and FB_2 (5 µg/ml each) for 1h at 25°C.
EPS: exopolysaccharides; PGN: peptidoglycan; LTA: lipoteichoic acids; PBP: Penicillin binding protein

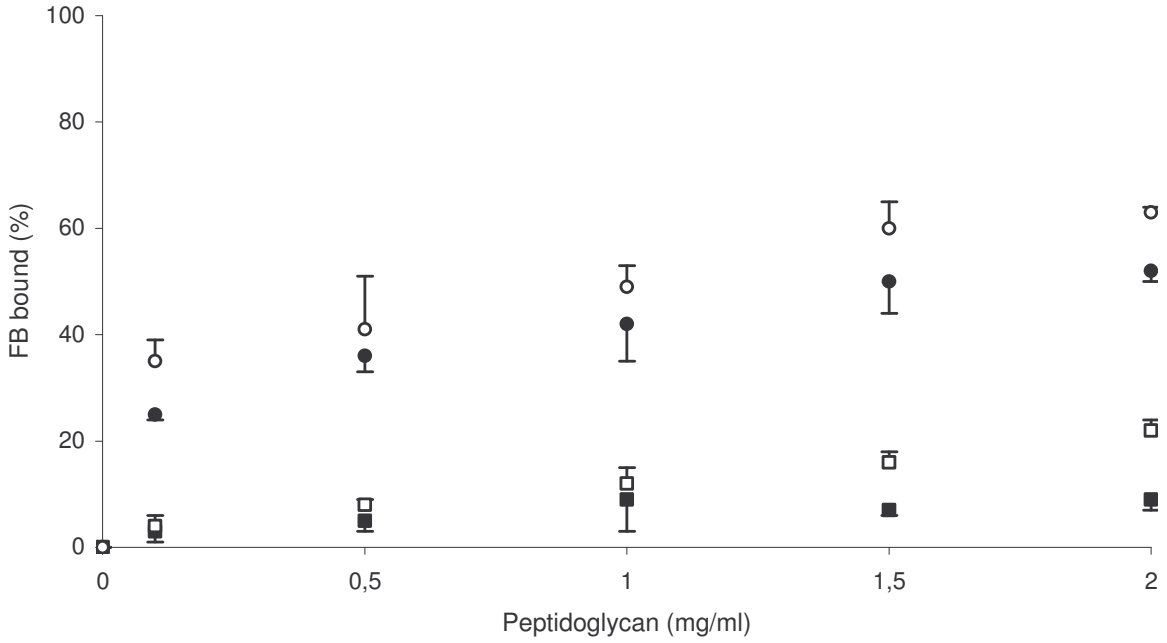


Fig. 2. Fractions of fumonisins B_1 (□,■) and B_2 (○,●) bound to purified peptidoglycans from *Bacillus subtilis* (white marks) and *Micrococcus luteus* (black marks). Data shown are the mean and standard deviations (error bars) of triplicates.

Binding assays with commercial purified PG from Gram positive bacteria showed that these polymers can bind FB in an analogue dependent manner (FB_2>FB_1) (Fig. 2) consistent with our results obtained with intact LAB, thus, confirming that PG is likely the binding site of FB. Significant bound fractions were observed even with the lowest concentration tested (0.1 mg PG/ml). However, the binding efficiency varied between the two purified PG tested. The PG backbone is a conserved structure composed of linear glycan chains alternating N-acetyl glucosamine (GlcNAc) and N-acetyl muramic acid (MurNAc) in β (1 → 4) linkage. These chains are crosslinked by means of short peptides. The specific amino acid sequence of bridges and consequently, the molecular structure of PG vary with the bacterial species [53]. Since the bound fraction of FB varied between the PG tested (*B. subtilis*>*M. luteus*), but also among genera of LAB [54], it seems that the amino acid sequence play an important role in the efficiency of the mechanism. This hypothesis is supported by the only partial inhibition of binding when bacteria were treated with lysozyme or mutanolysin, which act on the glycan chain and not on the oligopeptides. The PG structure vary mainly in the amino acid in position 3 (AA_3) of the peptide bridge and in the cross-linking amino acids. Since the AA_3 of *B. subtilis* and *M. luteus* is *méso*-diaminopimelic acid (*m*-DAP) and L-Lys, respectively [53], this difference could explain the dissimilar efficiency of their PG. However, this reasoning can not be used to explain our results showing that the *Streptococcus* genus is more efficient than the *Lactobacillus* genus, because the AA_3 is L-Lys in both genera. The difference of binding efficiency could be rather due to the aminoacid sequence of the cross-bridge, which differ in Streptococci / Enterococci [$(L\text{-}Ala)_{2\text{-}3}$] and Lactobacilli (D-Asp), but also in the PG from *B. subtilis* (variable) and *M. luteus* (no aminoacid) [53, 55].

In addition, we observed inhibition of FB_2 binding with mutants of *Lc. lactis*, in which the expression of genes coding PBP 2A and 2B, and consequently the PG metabolism is perturbed [56] (P<0.05) (Table 2). In contrast, the mechanism of immobilization of bacteria (phenomenon of adhesion, chain and biofilm formation), characterized by natural PG modifications consisting of little breaks in the PG structure [57], seems not to be associated with FB binding. Indeed, mutants *acmA* and *ponA* from *Lc. lactis*, in which the immobilization property was modified [58], had no effect on binding as compared to wild type *Lc. lactis* (P>0.05).

3.2 Fumonisin structure/binding activity relationships

When the free-amine groups of FB_1 and FB_2 were inactivated by complexation with OPA, the proportions of FB bound by *L. paraplantarum* CNRZ 1885 and *S. thermophilus* RAR1

Table 3. Effect of hydrolysis of fumonisin tricarballylic acid chains and free amine group inactivation on binding of fumonisins B_1 and B_2 by *Lactobacillus paraplantarum* and *Streptococcus thermophilus*

	Lactobacillus paraplantarum CNRZ 1885 [a]			*Streptococcus thermophilus RAR1* [a]		
Toxin	Free (%)[b]	Bound (%)[b]	Recov. (%)	Free (%)[b]	Bound (%)[b]	Recov. (%)
FB_1	73 ± 7	27 ± 2	100	59 ± 1	40 ± 1	99
HFB_1	80 ± 6	14 ± 0 *	94	85 ± 10 *	22 ± 1 *	107
FB_2	19 ± 1	74 ± 1	93	27 ± 1	71 ± 3	98
HFB_2	43 ± 4 *	46 ± 11 *	89	48 ± 4 *	45 ± 3 *	93
FB_1[c]	89 ± 1			81 ± 1		
FB_1-OPA	68 ± 2 **			66 ± 8 **		
FB_2[c]	56 ± 4			31 ± 4		
FB_2-OPA	48 ± 0			26 ± 0		

[a] Bacterial density = 10^{10} CFU/ml.
[b] Values are means ± SD from triplicate.
[c] Treated like FB-OPA complexes.
* and ** means that binding of modified FB was significantly decreased or increased, respectively (P<0.05) compared to intact FB.

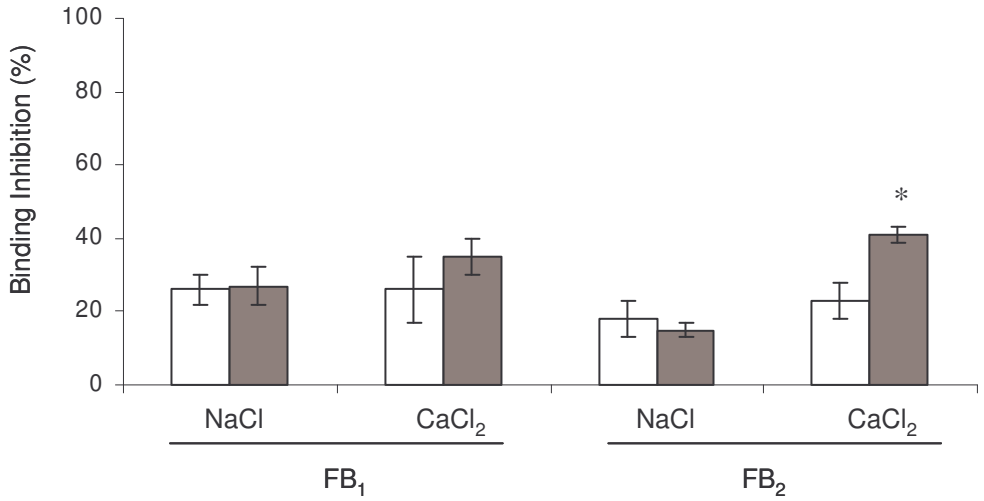


Fig. 3. Effect of monovalent and divalent salts on fumonisins B_1 and B_2 binding by *Streptococcus thermophilus* RAR1. Bacteria were incubating in acidified corn infusion containing NaCl or $CaCl_2$ (0.1M, in white, or 0.5M, in grey) and a mixture of FB_1 and FB_2 (5 µg/ml, each) at 25°C for 1 h. Data shown are the means of triplicates and error bars represent standard deviations. * means that the inhibition of binding was significantly higher when the concentration of salt increased (P<0.05).

were higher than those observed with intact FB (Table 3). This effect was more pronounced for FB_1 ($P<0.05$) than FB_2 ($P>0.05$). Thus, it appears that this function is not involved in FB_1 and FB_2 interaction with bacteria. In acidic conditions, the ionized state of the amine function could even inhibit it, in particular for FB_1. Inversely, the binding rates of HFB_1 and HFB_2 of both strains was greatly lower than FB_1 and FB_2, respectively ($P<0.05$). These results indicate that at least one of TCA arms seems to play a role in the mechanism. However, the binding activity of analogues remained different ($FB_2>FB_1$, $HFB_2>HFB_1$, FB_2-OPA>FB_1-OPA). The hypothesis of TCA involvement is consolidated by the inhibition of binding by *Streptococcus thermophilus* RAR1 when monovalent (NaCl) or divalent ($CaCl_2$) salts were added in the medium (Fig. 3). Indeed, fumonisins are tetraacids like EDTA and have been suggested as possible chelators [59]. If FB can complex cations with TCA arms, they may be less available to interact with bacteria. The inhibition of FB_2 binding by $CaCl_2$ increased with concentration ($P<0.05$), while similar results were obtained with the NaCl concentration tested of 0.1M and 0.5M.

In spite of similar structure, FB_2 is always more bound than FB_1 [35, 54]. Thus, the only one structural variation, consisting in an additional hydroxyl group in C_{10} present in FB_1 plays directly or indirectly a negative role in binding. The molecular modeling showed that, in simulated aqueous conditions, a hydrogen bond is formed between the H of the hydroxyl group at C_{10} of FB_1 and the O of the carbonyl group of the TCA at C_{15} (Fig. 4), what could decrease its availability to be bound to the bacterial cell wall. These molecular configurations were conserved in acidic conditions since the addition of charges on functional groups of FB_1 and FB_2 did not affect the results of modeling. However, since HFB_2 was more bound than HFB_1, it seems that the hydroxyl group in C_{10} continues to be unfavorable to binding after TCA removal.

3.3 Conclusions

In this work, we demonstrated that PG of LAB, and generally PG of Gram positive bacteria, are the most likely site of FB binding. This result can help to explain the widespread binding of fumonisins and other mycotoxins by LAB. Differences in bacterial sp. binding can be rationally explained by the variation in PG structure. This observation should allow to select efficient strains destined to starters and/or probiotic mixtures on the base of the PG-type. We also showed that at least one TCA arm of FB play an important role in their bacterial binding. Since it was reported that TCA also affect favourably the intestinal absorption [60, 61], binding of FB_1 and FB_2 could decrease even more their absorption and

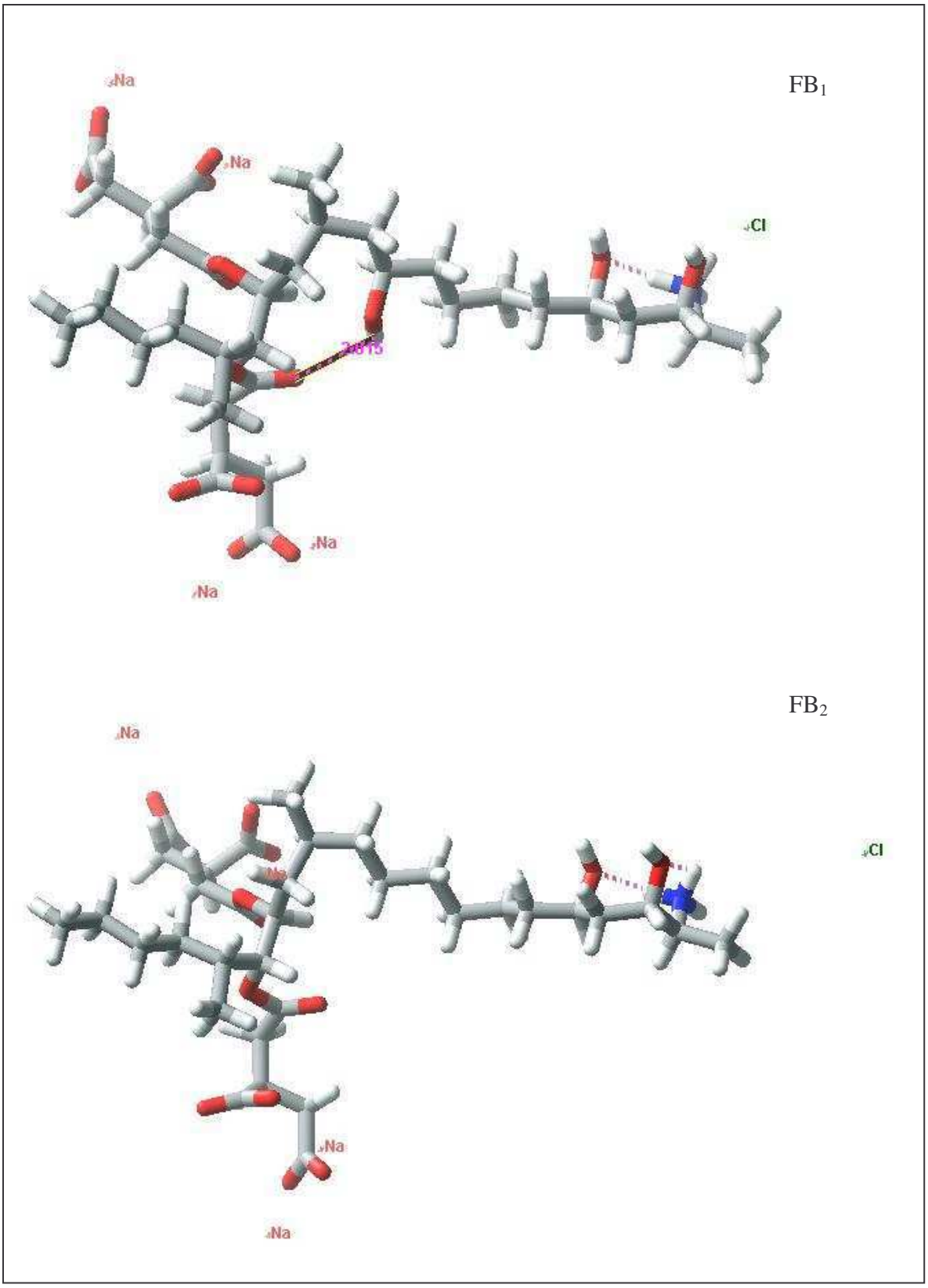


Fig. 4 : Molecular configurations of FB_1 and FB_2 in aqueous solution. The presented forms are in their ionised state.

their toxicity on the intestinal mucosal cells. However, further *in vivo* investigations are needed to evaluate the real impact of the binding activity on the bioavailability of FB in higher organism.

Acknowledgments

V. Niderkorn is the recipient of a CIFRE Lallemand SA research fellowship. The authors are thankful to the the Research Unit for Food Process Engineering and Microbiology, INRA, Thivernal-Grignon, France; the CNRS, FRE2326 Strasbourg, France; the Microbial Genetics Unit, INRA, Jouy-en-Josas, France, and the Dairy Research and Applied Genetics Unit, INRA, Jouy-en-Josas, France, for providing the strains and mutants used in this work.

References

[1] G.S. Shephard, P.G. Thiel, S. Stockenstrom, E.W. Sydenham, Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products, *J. AOAC Int.* 79(3) (1996) 671-687.

[2] J.M. Soriano, S. Dragacci, Occurrence of fumonisins in foods, *Food Res. Intern.* 37(10) (2004) 985-1000.

[3] S.C. Lamprecht, W.F.O. Marasas, J.F. Alberts, M.E. Cawood, W.C.A. Gelderblom, G.S. Shephard, P.G. Thiel, F.J. Calitz, Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato, *Phytopathology* 84(4) (1994) 383-391.

[4] H.K. Abbas, W.C.A. Gelderblom, M.E. Cawood, W.T. Shier, Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in Jimsonweed (*Datura Stramonium* L) and mammalian cell cultures, *Toxicon* 31(3) (1993) 345-353.

[5] W.C.A. Gelderblom, M.E. Cawood, S.D. Snyman, R. Vleggaar, W.F.O. Marasas, Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays, *Food Chem. Toxicol.* 31(6) (1993) 407-414.

[6] P.G. Thiel, W.F.O. Marasas, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, W.C.A. Gelderblom, The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health, *Mycopathologia* 117(1-2) (1992) 3-9.

[7] J.P. Rheeder, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, G.S. Shephard, D.J. Vanschalkwyk, *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei, *Phytopathology* 82(3) (1992) 353-357.

[8] S. Franceschi, E. Bidoli, A.E. Baron, C. la Vecchia, Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy, *J. Natl. Cancer Inst.* 82(17) (1990) 1407-1411.

[9] G.S. Shephard, W.F.O. Marasas, N.L. Leggott, H. Yazdanpanah, H. Rahimian, N. Safavi, Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran, *J. Agric. Food Chem.* 48(5) (2000) 1860-1864.

[10] H. Wang, H. Wei, J. Ma, X. Luo, The fumonisin B1 content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19(1-2) (2000) 139-141.

[11] H. Vainio, E. Heseltine, J. Wilbourn, Report on an IARC working group meeting on some naturally-occurring substances, *Int. J. Cancer* 53(4) (1993) 535-537.

[12] R.T. Riley, J.L. Showker, D.L. Owens, P.F. Ross, Disruption of sphingolipid metabolism and induction of equine leukoencephalomalacia by *Fusarium proliferatum* culture material containing fumonisin B-2 or B-3, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 3(3) (1997) 221-228.

[13] P.F. Ross, L.G. Rice, J.C. Reagor, G.D. Osweiler, T.M. Wilson, H.A. Nelson, D.L. Owens, R.D. Plattner, K.A. Harlin, J.L. Richard, B.M. Colvin, M.I. Banton, Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases, *J. Vet. Diagn. Invest.* 3(3) (1991) 238-241.

[14] L.R. Harrison, B.M. Colvin, J.T. Greene, L.E. Newman, J.R. Cole, Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*, *J. Vet. Diagn. Invest.* 2(3) (1990) 217-221.

[15] G.W. Smith, P.D. Constable, C.W. Bacon, F.I. Meredith, W.M. Haschek, Cardiovascular effects of fumonisins in swine, *Fundam. Appl. Toxicol.* 31(2) (1996) 169-172.

[16] K.A. Voss, R.D. Plattner, R.T. Riley, F.I. Meredith, W.P. Norred, *In vivo* effects of fumonisin B-1 producing and fumonisin B-1 nonproducing *Fusarium moniliforme* isolates are similar: Fumonisins B-2 and B-3 cause hepato- and nephrotoxicity in rats, *Mycopathologia* 141(1) (1998) 45-58.

[17] E. Wang, W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley, A.H. Merrill, Jr., Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*, *J. Biol. Chem.* 266(22) (1991) 14486-14490.

[18] R.T. Riley, E. Enongene, K.A. Voss, W.P. Norred, F.I. Meredith, R.P. Sharma, J. Spitsbergen, D.E. Williams, D.B. Carlson, A.H. Merrill, Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 301-308.

[19] C. Jones, J.R. Ciacci-Zanella, Y.G. Zhang, G. Henderson, M. Dickman, Analysis of fumonisin B-1-induced apoptosis, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 315-320.

[20] W.C.A. Gelderblom, D. Galendo, S. Abel, S. Swanevelder, W.F.O. Marasas, C.P. Wild, Cancer initiation by fumonisin B-1 in rat liver - role of cell proliferation, *Cancer Lett.* 169(2) (2001) 127-137.

[21] K.A. Voss, P.C. Howard, R.T. Riley, R.P. Sharma, T.J. Bucci, R.J. Lorentzen, Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B-1: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F-verticillioides*), *Cancer Detect. Prev.* 26(1) (2002) 1-9.

[22] W.T. Shier, The fumonisin paradox: A review of research on oral bioavailability of fumonisin B-1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, *J. Toxicol. Toxin. Rev.* 19(2) (2000) 161-187.

[23] W.P. Norred, R.D. Plattner, W.J. Chamberlain, Distribution and excretion of 14C fumonisin B1 in male Sprague-Dawley rats, *Nat. Toxins* 1(6) (1993) 341-346.

[24] G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, J.F. Alberts, W.C.A. Gelderblom, Fate of a single dose of the C-14-labeled mycotoxin, fumonisin-B1, in rats, *Toxicon* 30(7) (1992) 768-770.

[25] M.R. Martinez-Larranaga, A. Anadon, M.J. Diaz, M.L. Fernandez-Cruz, M.A. Martinez, M.T. Frejo, M. Martinez, R. Fernandez, R.M. Anton, M.E. Morales, M. Tafur, Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B-1, *Vet. Hum. Toxicol.* 41(6) (1999) 357-362.

[26] D.B. Prelusky, H.L. Trenholm, M.E. Savard, Pharmacokinetic fate of 14C-labelled fumonisin B1 in swine, *Nat. Toxins* 2(2) (1994) 73-80.

[27] D.K. Vudathala, D.B. Prelusky, M. Ayroud, H.L. Trenholm, J.D. Miller, Pharmacokinetic fate and pathological effects of 14C-fumonisin B1 in laying hens, *Nat. Toxins* 2(2) (1994) 81-88.

[28] G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, J.F. Alberts, M.E. Cawood, Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B-1 in a nonhuman primate, *Toxicon* 32(6) (1994) 735-741.

[29] D.B. Prelusky, M.E. Savard, H.L. Trenholm, Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration, *Nat. Toxins* 3(5) (1995) 389-394.

[30] G.S. Shephard, P.G. Thiel, E.W. Sydenham, P.W. Snijman, Toxicokinetics of the mycotoxin fumonisin B-2 in rats, *Food Chem. Toxicol.* 33(7) (1995) 591-595.

[31] G.S. Shephard, P.W. Snijman, Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B-2 in a nonhuman primate, *Food Chem. Toxicol.* 37(2-3) (1999) 111-116.

[32] L. van der Westhuizen, G.S. Shephard, D.J. van Schalkwyk, The effect of a single gavage dose of fumonisin B-2 on the sphinganine and sphingosine concentrations in vervet monkeys, *Food Chem. Toxicol.* 39(5) (2001) 455-459.

[33] S. Bouhet, E. Hourcade, N. Loiseau, A. Fikry, S. Martinez, M. Roselli, P. Galtier, E. Mengheri, I.P. Oswald, The mycotoxin fumonisin B-1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells, *Toxicol. Sci.* 77(1) (2004) 165-171.

[34] S. Bouhet, E. Le Dorze, S. Peres, J.M. Fairbrother, I.P. Oswald, Mycotoxin fumonisin B-1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: *in vivo* and *in vitro* studies, *Food Chem. Toxicol.* 44(10) (2006) 1768-1773.

[35] V. Niderkorn, H. Boudra, D.P. Morgavi, Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*, *J. Appl. Microbiol.* 101(4) (2006) 849-856.

[36] V. Niderkorn, D.P. Morgavi, E. Pujos, A. Tissandier, H. Boudra, Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage, *Food Addit. Contam. in press.*

[37] M.P. Mokoena, P.K. Chelule, N. Gqaleni, Reduction of fumonisin B1 and zearalenone by lactic acid bacteria in fermented maize meal, *J. Food Prot.* 68(10) (2005) 2095-2099.

[38] C. Haskard, C. Binnion, J. Ahokas, Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, *Chem.-Biol. Interact.* 128(1) (2000) 39-49.

[39] H.S. El-Nezami, N. Polychronaki, S. Salminen, H. Mykkanen, Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol, *Appl. Environ. Microbiol.* 68(7) (2002) 3545-3549.

[40] H.S. El-Nezami, A. Chrevatidis, S. Auriola, S. Salminen, H. Mykkanen, Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*, *Food Addit. Contam.* 19(7) (2002) 680-686.

[41] P. Kankaanpaa, E. Tuomola, H. El-Nezami, J. Ahokas, S.J. Salminen, Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model, *J. Food Prot.* 63(3) (2000) 412-414.

[42] S. Gratz, H. Mykkanen, A.C. Ouwehand, R. Juvonen, S. Salminen, H. El-Nezami, Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 *in vitro*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10) (2004) 6306-6308.

[43] S. Gratz, M. Taubel, R.O. Juvonen, M. Viluksela, P.C. Turner, H. Mykkanen, H. El-Nezami, *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats, *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11) (2006) 7398-7400.

[44] H.S. El-Nezami, N.N. Polychronaki, J. Ma, H.L. Zhu, W.H. Ling, E.K. Salminen, R.O. Juvonen, S.J. Salminen, T. Poussa, H.M. Mykkanen, Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China, *Am. J. Clin. Nutr.* 83(5) (2006) 1199-1203.

[45] G. Pagliuca, E. Zironi, A. Ceccolini, R. Matera, G.P. Serrazanetti, A. Piva, Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B-1 and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 819(1) (2005) 97-103.

[46] L.D. Williams, F.I. Meredith, R.T. Riley, Fumonisin-ortho-phthalaldehyde derivative is stabilized at low temperature, *J. Chromatogr. B* 806(2) (2004) 311-314.

[47] J. Delcour, T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, P. Hols, The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 76(1) (1999) 159-184.

[48] H. El-Nezami, P. Kankaanpaa, S. Salminen, J. Ahokas, Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media, *J. Food Prot.* 61(4) (1998b) 466-468.

[49] J.E. Heckels, M. Virji, Separation and purification of surface components, in: I.C.a.P. Hancock, I.R. (Ed.), Bacterial Cell Surface Techniques, John Wiley & Sons, New York, 1988. pp. 67-135.

[50] A. Quiberoni, J.I. Stiefel, J.A. Reinheimer, Characterization of phage receptors in *Streptococcus thermophilus* using purified cell walls obtained by a simple protocol, *J. Appl. Microbiol.* 89(6) (2000) 1059-1065.

[51] B. Dahlback, M. Hermansson, S. Kjelleberg, B. Norkrans, The hydrophobicity of bacteria - an important factor in their initial adhesion at the air-water interface, *Arch. Microbiol.* 128(3) (1981) 267-270.

[52] S.J. Lahtinen, C.A. Haskard, A.C. Ouwehand, S.J. Salminen, J.T. Ahokas, Binding of aflatoxin B-1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, *Food Addit. Contam.* 21(2) (2004) 158-164.

[53] K.H. Schleifer, O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriol. Rev.* 36(4) (1972) 407-477.

[54] V. Niderkorn, D.P. Morgavi, E. Pujos, A. Tissandier, H. Boudra, Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an *in vitro* model simulating corn silage, *Food Addit. Contam.* in press. (200...).

[55] A. Bouhss, N. Josseaume, A. Severin, K. Tabei, J.E. Hugonnet, D. Shlaes, D. Mengin-Lecreulx, J. van Heijenoort, M. Arthur, Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan, *J. Biol. Chem.* 277(48) (2002) 45935-45941.

[56] M. Shohayeb, I. Chopra, Mutations affecting penicillin-binding proteins 2a, 2b and 3 in *Bacillus subtilis* alter cell shape and peptidoglycan metabolism, *J. Gen. Microbiol.* 133(7) (1987) 1733-1742.

[57] M. Ibrahim, R. Briandet, M.Y. Mistou, A. Chretien, J. Tremblay, S. Kulakauskas, Immobilization of lactococci, *Lait* 84(1-2) (2004) 103-114.

[58] C. Mercier, C. Durrieu, R. Briandet, E. Domakova, J. Tremblay, G. Buist, S. Kulakauskas, Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation, *Mol. Microbiol.* 46(1) (2002) 235-243.

[59] R.C. Beier, M.H. Elissalde, L.H. Stanker, Calculated 3-Dimensional structures of the fumonisin B-1-4 mycotoxins, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54(4) (1995) 479-487.

[60] I.d. Angelis, G. Frigge, F. Raimondi, A. Stammati, F. Zucco, F. Caloni, Absorption of Fumonisin B1 and aminopentol on an *in vitro* model of intestinal epithelium; the role of P-glycoprotein, *Toxicon* 45(3) (2005) 285-291.

[61] W.R. Dantzer, J. Hopper, K. Mullin, S. Hendrich, P.A. Murphy, Excretion of C-14-Fumonisin B-1, C-14-hydrolyzed fumonisin B-1, and C-14-Fumonisin B-1-fructose in rats, *J. Agric. Food Chem.* 47(10) (1999) 4291-4296.

DISCUSSION GENERALE

Les ensilages constituent des aliments à risque vis-à-vis de la contamination par les fusariotoxines et leurs possibles conséquences sur les performances zootechniques et la santé des animaux d'élevage. En effet, les ensilages peuvent représenter jusqu'à 85% de la ration et, étant fabriqués *in situ* à la ferme, ils ne sont pas soumis au contrôle. Face à l'incapacité de prévenir totalement la contamination au champ et à l'inadaptabilité des méthodes de détoxification actuelles, nous avons décidé d'explorer la capacité de certains microorganismes à réduire l'impact des fusariotoxines sur les animaux. Dans ce contexte, les bactéries fermentaires (lactiques et propioniques) apparaissent comme de bons microorganismes candidats compte tenu de leur rôle naturel dans la fermentation, de leur présence dans les conservateurs biologiques d'ensilage, mais aussi de leurs possibles propriétés probiotiques.

1. La séquestration des fusariotoxines: un phénomène largement répandu chez les bactéries fermentaires ?

Les travaux antérieurs sur la capacité des bactéries fermentaires à séquestrer les fusariotoxines n'ont porté que sur deux souches de *Lactobacillus rhamnosus* et une souche de *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* (El-Nezami *et al.* 2002a; 2002b). Or, les résultats que nous avons obtenus lors du criblage de souches montrent que, dans les conditions d'expérimentation, tous les genres de bactéries fermentaires testés présentent cette activité. La séquestration des fusariotoxines semble donc être **un phénomène répandu** chez ces bactéries plutôt qu'une propriété particulière de quelques souches.

Le criblage d'un nombre important de souches nous a également permis de dégager une tendance sur les différences de séquestration entre fusariotoxines et entre genres bactériens. Ainsi, **la ZEN et la FB_2 sont davantage séquestrées que la FB_1 et le DON**, et **les genres *Streptococcus* et *Enterococcus*, proches physiologiquement, sont significativement plus efficaces que les autres genres de bactéries fermentaires pour séquestrer la ZEN et les fumonisines**.

D'autre part, la plupart des études antérieures sur la séquestration des mycotoxines ont été réalisées en milieu tampon (pH neutre) à une concentration bactérienne de 10^9 – 10^{10} UFC/ml (El-Nezami *et al.* 1998; 2002a; 2002b). Les auteurs de ces études ont montré qu'avec les souches testées, les mycotoxines n'étaient significativement séquestrées que lorsque la densité bactérienne est au minimum de 10^9 UFC/ml. Nous avons montré que, dans des

conditions simulant les ensilages de maïs (infusât de maïs acidifié à pH 4), la séquestration est bien dépendante de la concentration bactérienne (Niderkorn *et al.* 2006) mais que des taux de séquestration significatifs pouvaient être observés à partir d'une densité de 10^8 UFC/ml. **Cette concentration bactérienne est compatible avec le potentiel de croissance des bactéries fermentaires dans les ensilages** (Weinberg *et al.* 2004a). Lors de leur croissance au cours de la fermentation, les bactéries lactiques d'origine épiphitique et/ou ajoutées (inoculant) peuvent donc probablement séquestrer une fraction des fusariotoxines présentes sur les végétaux à la mise en silo. Cependant, selon la composition de la flore lactique épiphytique et selon que la fermentation est réalisée ou non avec l'aide d'un inoculant, les proportions des différentes espèces de bactéries fermentaires varient (McDonald *et al.* 1991; Nishino *et al.* 2004). Des différences de taux de séquestration entre genres, espèces et souches ayant été observées, **les fractions de fusariotoxines séquestrées pourraient varier d'un ensilage à l'autre et, en particulier, augmenter avec la densité de certaines souches appartenant notamment aux genres *Streptococcus* et *Enterococcus***.

Il convient cependant de préciser que les conditions utilisées pour évaluer le potentiel des bactéries fermentaires a été réalisé *in vitro* en milieu liquide. Bien que nous ayons veillé à nous approcher au maximum des propriétés physico-chimiques des ensilages, la nature physique et l'hétérogénéité de ce type d'aliment font que le niveau de séquestration mesuré lors de nos essais n'est certainement pas identique à celui de la situation réelle. Cependant, les différences observées entre genres bactériens devraient pouvoir y être également perceptibles.

Nous avons également montré que, même lorsque la ZEN n'est pas préalablement complexée aux bactéries fermentaires, cette fusariotoxine est instantanément séquestrée dans du contenu ruminal de mouton nourri au foin. Compte tenu de la densité de bactéries fermentaires dans le rumen, la séquestration de la ZEN par ces bactéries est probable. La présence de nombreuses autres bactéries gram positives, source importante de peptidoglycane dans le rumen, pourrait également contribuer à la séquestration. Le complexe ainsi formé apparaît stable dans les conditions des compartiments post-ruminaux du tube digestif des ruminants.

La séquestration des fusariotoxines dans le rumen n'a jamais été considérée, mais **une diminution de leur absorption due à cette activité pourrait contribuer, en plus de la métabolisation dans le rumen, à la plus forte résistance des ruminants par rapport aux**

espèces monogastriques vis-à-vis des mycotoxines. Cette activité pourrait aussi contribuer au faible transfert des fusariotoxines dans les produits animaux. Cette hypothèse est confortée par des taux importants de fusariotoxines sous forme non conjuguées dans les fèces alors que dans le plasma, les urines et le lait, les formes conjuguées dominent (Usleber *et al.* 1992). De plus, la forte proportion de *Streptococcus bovis* dans le contenu ruminal (Krause *et al.* 2003) conjuguée au fort potentiel de séquestration des *Streptococci* (que nous avons vérifié chez une souche de cette espèce) va également dans le sens de la protection des ruminants. Comme une ration riche en grain entraîne une forte concentration ruminale de bactéries lactiques, la fraction de fusariotoxines séquestrées pourrait être élevée avec ce régime. En revanche, lorsque le régime est riche en fibres, la concentration de bactéries lactiques pourrait être insuffisante pour séquestrer efficacement les fusariotoxines même si avec ce régime, le rapport *Streptococci*/*Lactobacilli* augmente.

Bien que les données pharmacocinétiques soient encore limitées, les fusariotoxines semblent rapidement absorbées dans l'organisme des animaux de ferme, suggérant une absorption dans les premiers compartiments du TGI (Cf. synthèse bibliographique, I-2.1). Nos essais ont montré que le complexe formé entre la ZEN et le contenu ruminal est plus stable dans les conditions des compartiments post-ruminaux du tube digestif que le complexe *Streptococcus thermophilus* RAR1 - ZEN. Comme cette souche était la plus performante pour séquestrer la ZEN lors du criblage de souches, **l'utilisation de bactéries lactiques sélectionnées pour réduire les effets toxiques de la ZEN apparaît peu pertinente chez les ruminants.**

En revanche, l'utilisation de la capacité de séquestration de la ZEN par des souches de bactéries fermentaires (notamment les *Streptococci* ou les *Enterococci*) pourrait être **intéressante chez les animaux monogastriques**. Les résultats obtenus sur la stabilité du complexe ZEN - *Streptococcus thermophilus* RAR1 dans les conditions de l'estomac et de l'intestin grêle permettent d'envisager une diminution de la biodisponibilité de la ZEN chez ce type d'animaux, bien qu'un relarguage partiel ait été observé au cours de nos essais. Le porc, relativement sensible aux effets de la ZEN et potentiellement consommateur de céréales fermentées, pourrait constituer une cible pertinente.

2. Implication du peptidoglycane et influence de la structure des fusariotoxines sur le mécanisme de séquestration

En choisissant les fumonisines comme mycotoxines d'étude, nous avons montré que celles-ci pouvaient être efficacement séquestrées par du peptidoglycane commercial purifié à partir de bactéries Gram positives. Le PG (ou des composés finement associés à celui-ci) a également été suggéré comme la structure séquestrant l'AFB_1 (Lahtinen *et al.* 2004). **L'implication du PG dans le mécanisme** pourrait expliquer le fort potentiel de séquestration des bactéries lactiques chez lesquelles la proportion de PG est importante et la faible efficacité des bactéries Gram négatives pauvres en PG (El-Nezami *et al.* 1998). Compte tenu de sa structure en réseau composée de chaînes de glycanes reliées par des ponts interpeptidiques (**figure 4**), le PG peut être comparé à la maille d'un filet. Son implication directe dans le mécanisme d'élimination des fumonisines, et probablement dans celui des autres mycotoxines, donne tout son sens au terme « séquestration ».

Nous avons également montré **qu'une différence structurale mineure, comme celle des fumonisines B_1 et B_2, peut entraîner des taux de séquestration très différents**. Cette variabilité a également été observée avec certains trichothécènes comme le DON et le 3-acDON (El-Nezami *et al.* 2002a). Ceci n'est cependant pas un cas général car la ZEN et l'α ZOL sont séquestrés de façon identique (El-Nezami *et al.* 2002b). D'une manière générale, ces différences ne devraient pouvoir être observées que lorsque le groupement qui diffère joue un rôle direct (liaison au site de fixation) ou indirect comme c'est le cas des fumonisines, où le groupement OH sur la chaîne aliphatique de la FB_1 est engagé dans une liaison hydrogène avec un bras d'acide tricarballyque dont nous avons montré l'implication.

Le mécanisme de séquestration de la ZEN par la paroi de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été récemment élucidé par un chercheur de notre laboratoire (Yiannikouris *et al.* 2004a; Yiannikouris *et al.* 2004b). Les chaînes de β-1,3-D-glucanes assurent une association intra-hélicoïdale stable avec la ZEN, stabilisée par les chaînes latérales de β-1,6-D glucanes. **Ce mécanisme apparaît être différent de celui mettant en jeu le PG des bactéries fermentaires** puisque les chaînes de glycane du PG (NAG β-1,4 NAM) ne sont pas de même nature et sont linéaires.

3. Implications de la biotransformation de la zéaralénone en α zéaralénol par certaines bactéries lactiques

Si la séquestration des fusariotoxines semble être une activité largement répandue chez les bactéries fermentaires, leur biotransformation par ces bactéries est beaucoup plus rare et n'avait jamais été mise en évidence avant ces travaux. Lors du criblage de souches, nous avons montré que certaines souches de *Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. fermenti* et *Leuconostoc mesenteroides* sont capables de réduire la ZEN en α ZOL. Chez les mammifères, cette réaction correspond à une bioactivation de la ZEN car l'α ZOL est connu comme étant 3 à 4 fois plus toxique que la molécule-mère. Cette bioactivation à lieu essentiellement dans le foie après absorption de la ZEN. Cependant, il se pourrait que l'α ZOL soit moins absorbable que la ZEN au niveau de la barrière intestinale. Dans ce cas, les souches de bactéries fermentaires capables de réduire la ZEN en α ZOL dans les aliments ou dans les tous premiers compartiments du TGI pourraient diminuer le taux plasmatique de ZEN et de ses métabolites.

En revanche, si l'α ZOL est autant absorbé que la ZEN, une croissance importante de telles souches dans des aliments contenant de la ZEN pourrait augmenter le risque d'apparition des effets oestrogéniques provoqués par cette fusariotoxine. Ces aliments peuvent être destinés à la nutrition animale (ensilages d'herbe et de maïs plante entière, ensilages grains humides), mais aussi à la nutrition humaine. De nombreux plats traditionnels d'Afrique, d'Asie et d'Amérique latine sont basés sur la fermentation lactique spontanée des céréales (Haard *et al.* 1999). Dans une moindre mesure, sont également concernés les légumes et les produits animaux fermentés, même si le transfert de ZEN dans le lait et les tissus comestibles est *a priori* faible. Néanmoins, il semble préférable que les différents ferments et inoculants, destinés à acidifier des denrées présentant un risque de contamination par la ZEN, ne puissent pas réaliser la biotransformation en α ZOL, d'autant que les souches bactériennes qui les composent deviennent généralement dominantes dans les aliments concernés.

Au-delà des aspects liés à la sécurité alimentaire, la capacité de certaines souches de bactéries lactiques à réaliser cette réduction de la zéaralénone laisse envisager d'autres propriétés qui pourraient y être associée. Nous avons vérifié l'hypothèse selon laquelle la 3α-HSD de *Comamonas testosteroni* (3α-HSD d'origine bactérienne disponible dans le commerce) pourrait réduire la ZEN en α ZOL tout comme la 3α-HSD hépatique des

mammifères (Cf Partie expérimentale. I.3.2). Les bactéries lactiques capables de réaliser cette biotransformation pourrait donc posséder une 3α-HSD fonctionnellement similaire à celle de *C. testosteroni*. Dans ce cas, la ZEN ne serait pas le seul substrat pour l'enzyme chez ces souches de bactéries lactiques puisque la 3α-HSD de *C. testosteroni* peut catalyser l'oxydoréduction de plusieurs autres substrats stéroïdiens et non stéroïdiens.

4. Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a permis d'explorer le potentiel des bactéries fermentaires à détoxifier des végétaux contaminés par les fusariotoxines. A travers un criblage de souches réalisé à l'aide d'un test *in vitro* mis au point pour simuler les conditions des ensilages de maïs en terme de substrat, d'acidité et de concentration bactérienne, nous avons montré que ces bactéries sont capables de séquestrer les fusariotoxines majeures, à des niveaux variables selon le genre bactérien et le type de toxine. Les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* apparaissent plus efficaces que les autres genres fréquemment retrouvés dans les ensilages comme *Lactobacillus*, *Leucocostoc* ou *Lactococcus*. La ZEN et la FB_2 sont davantage séquestrées que le DON et la FB_1. Cette activité de séquestration pourrait permettre de diminuer la biodisponibilité des fusariotoxines dans l'organisme des animaux d'élevage. Des essais ont montré que cette activité de séquestration est également largement présente dans le contenu ruminal, ce qui pourrait contribuer à la moindre sensibilité des ruminants vis-à-vis des effets des mycotoxines. D'autre part, nous avons également montré qu'environ 5% des souches testées sont capables de réduire la ZEN en α ZOL dans les conditions du criblage de souches. Cette biotransformation correspond à une bioactivation de la ZEN et ne peut donc pas être considérée comme une détoxification. Enfin, en utilisant les fumonisines comme modèle d'étude, nous avons montré que le PG est très probablement le composant de la paroi des bactéries fermentaires impliqué dans le mécanisme de séquestration. Les bras d'acide tricarballylique des fumonisines semblent également impliqués dans ce mécanisme et l'importante différence de séquestration observée entre la FB_1 et la FB_2 pourrait s'expliquer par le fait qu'une liaison hydrogène s'établit entre l'un de ces bras et un groupement hydroxyl présent sur la chaîne aliphatique de la FB_1 et absent chez la FB_2.

La diminution de la biodisponibilité des mycotoxines consécutive à leur séquestration pourrait **compléter** le rôle des bactéries fermentaires dans l'acidification des aliments et leurs effets probiotiques potentiels. Dans le cas de cocktails de souches, il faut trouver un

compromis car les différentes souches les composant vont se partager le potentiel de croissance dans les ensilages et dans le TGI, ce qui pourrait avoir comme conséquence de « diluer » l'effet recherché. De plus, les synergies et les antagonismes entre souches doivent être pris en compte. Dans ce contexte, l'espèce *Enterococcus faecium* apparaît particulièrement intéressante puisqu'elle cumule un effet probiotique, une efficacité particulière à acidifier précocement les végétaux ensilés et un potentiel important de séquestration des fusariotoxines. Bien que déjà largement utilisé comme additif, la tendance du genre *Enterococcus* à acquérir des facteurs de résistances aux antibiotiques peut cependant être un frein à son développement.

Dans un objectif de sélection, le potentiel d'une souche bactérienne à séquestrer les mycotoxines pourrait être évalué en le corrélant à une étude quantitative et qualitative du PG de ces souches. Pour cela, une connaissance fine des interactions entre le PG et les fusariotoxines est nécessaire. Par exemple, il serait intéressant de savoir quels acides aminés des ponts interpeptidiques du PG pourraient favoriser la séquestration d'une mycotoxine donnée. Ces connaissances pourraient permettre de mieux appréhender les interactions bactérie-mycotoxine dans les ensilages et le TGI, et d'envisager des solutions microbiologiques à des situations de contamination importante.

Pour évaluer l'efficacité réelle des bactéries fermentaires à diminuer la biodisponibilité des mycotoxines et le potentiel commercial de ce type d'agents, des essais *in vivo* sont cependant indispensables. Une étude récente sur la capacité de la souche probiotique LGG à diminuer la biodisponibilité de l'AFB_1 chez le rat montre des résultats encourageants (Gratz *et al.* 2006). Une augmentation significative des concentrations d'AFB_1 et de son métabolite l'AFM_1 dans les fèces a été observée en présence de cette souche. Afin d'évaluer plus précisément la baisse de biodisponibilité, le dosage plasmatique des mycotoxines pourrait compléter le dosage dans les fèces. Comme l'application de cette technologie apparaît moins pertinente chez les ruminants que chez les animaux monogastriques au vu de nos essais dans le contenu ruminal, le porc apparaît comme un modèle d'étude mieux adapté. L'apport d'aliments fermentés dans la ration du porc est par ailleurs l'objet d'un intérêt croissant car une amélioration des performances zootechniques comme le gain de poids (Geary *et al.* 1996; Russell *et al.* 1996; Geary *et al.* 1999; Shon *et al.* 2005) et une protection contre certaines infections bactériennes (Urlings *et al.* 1993) ont été observées. En particulier, une réduction des infections et des diarrhées provoquées par

certaines souches bactériennes de la famille des *Enterobacteriaceae* incluant les *Escherichia coli* entéropathogènes (Huang *et al.* 2004) et les *Salmonella* spp. (Prohaszka *et al.* 1990; Prohaszka 1991; Mikkelsen et Jensen 1998) a été clairement établie. La prolifération d'agents pathogènes dans le tractus digestif des porcelets au moment du sevrage a souvent conduit les éleveurs à utiliser des antibiotiques facteurs de croissance pour maintenir les performances et la santé des animaux. Face à l'évolution de la législation vers l'interdiction des antibiotiques en raison de l'acquisition possible d'une résistance à ces derniers par les microorganismes pathogènes (depuis le 1er janvier 2006 dans l'Union Européenne), l'utilisation de souches prébiotiques et probiotiques comme modulateurs de la santé du TGI fait partie des solutions alternatives envisagées (Metzler *et al.* 2005). **Dans ce cadre, l'intégration d'une protection contre les mycotoxines aux propriétés des probiotiques pourrait être intéressante.**

Certains résultats obtenus au cours de ce travail peuvent également intéresser la nutrition humaine dans un contexte où la sécurité alimentaire est devenue un enjeu majeur de la filière alimentaire. Le développement de solutions comme des ferments détoxifiants pour la préparation de repas à base de céréales fermentées dans les pays particulièrement exposés aux contaminations par les mycotoxines pourrait être une application potentielle de cette technologie.

Enfin, si la biotransformation de la ZEN en α ZOL par les bactéries lactiques apparaît peu valorisable, des études complémentaires pourraient mettre à jour des propriétés de métabolisation particulièrement interessantes chez ces bactéries. Les hypothèses posées précédemment doivent cependant être confirmées, à savoir que l'enzyme responsable de la transformation est bien une 3α-HSD et qu'elle est capable de catalyser l'oxydoréduction de plusieurs substrats stéroïdiens et non stéroïdiens. Dans le cas d'une confirmation de ces hypothèses, d'autres substrats xénobiotiques carbonylés pourraient être recherchés. De plus, d'autres enzymes appartenant à la famille des HSD pourraient être mises en évidence comme chez *C. testosteroni*, ouvrant la voie à la transformation de certains stéroïdes majeurs et de certains xénobiotiques.

Les bactéries fermentaires, grâce à leur statut particulier (agents de la fermentation, présence dans les flores digestives, effets probiotiques), cumulent de nombreux bénéfices. L'addition d'une allégation portant sur la réduction de l'impact des fusariotoxines serait un vrai plus. Bien que, d'après ces travaux, la séquestration semble être l'activité de

détoxification la plus pertinente chez ces bactéries, l'utilisation du génie génétique pour incorporer des capacités de biodégradation issues d'autres organismes dans les bactéries fermentaires est également une piste d'avenir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbas, H.K., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E. and Shier, W.T. (1993) Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in Jimsonweed (*Datura-Stramonium* L) and mammalian cell cultures. *Toxicon* **31**, 345-353.

Adler, A., Berger, C., Neuhauser, J. and Lew, H. (1997) Quantitative changes of epiphytic lactic acid bacteria on forage in the course of harvest and ensilage. *Bodenkultur* **48**, 165-171.

Adler, A. and Lew, H. (1995) Seasonal changes of epiphytic microorganisms on manured, Npk fertilized and not fertilized forage. *Bodenkultur* **46**, 223-240.

AFSSA (2004) Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques alimentaires (http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/26290-26291.pdf).

Almeida, A.P., Fonseca, H., Fancelli, A.L., Diretto, G.M., Ortega, E.M. and Corrèa, B. (2002) Mycoflora and fumonisin contamination in brazilian corn from sowing to harvest. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3877-3882.

Andrieu, J.P. and Demarquilly, C. (1998) Efficiency of biological silage additives: results of approval trials. *Fourrages*, **155**, 377-382.

Archibald, A.R., Hancock, I.C. and Harwood, C.R. (1993) Cell wall structure, synthesis, and turnover. In *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics* eds. Hoch, J.A. and Losick, R. American Society for Microbiology (ASM), Washington, USA, pp.381-410.

Asahara, N., Zhang, X.B. and Ohta, Y. (1992) Antimutagenicity and mutagen binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from japanese miso. *J. Sci. Food Agric.* **58**, 395-401.

Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. (2003) Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 1283-1290.

Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. (2004) Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 817-824.

Azcona-Olivera, J.I., Ouyang, Y., Murtha, J., Chu, F.S. and Pestka, J.J. (1995) Induction of cytokine messenger Rnas in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) - Relationship to toxin distribution and protein synthesis inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**, 109-120.

Bata, A. and Lasztity, R. (1999) Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 223-228.

Becker, B.A., Pace, L., Rottinghaus, G.E., Shelby, R., Misfeldt, M. and Ross, P.F. (1995) Effects of feeding fumonisin B1 in lactating sows and their suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.* **56**, 1253-1258.

Binder, J., Horvath, E.M., Schatzmayr, G., Ellend, N., Danner, H., Krska, R. and Braun, R. (1997) Screening for deoxynivalenol-detoxifying anaerobic rumen microorganisms. *Cereal Res. Commun.* **25**, 343-346.

Böhm, J. (2000) Study on biodegradation of some A- and B-trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycol. Res.* **16**.

Boisen, S. and Fernandez, J.A. (1997) Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **68**, 277-286.

Boswald (1995) Metabolism of *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol by yeast strains of technological relevance. *Nat. Toxins* **3**, 138-144.

Boudra, H., Le Bars, J., Le Bars, P. and Dupuy, J. (1994) Time of *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin formation in ripening of figs. *Mycopathologia* **127**, 29-33.

Boudra, H., Le Bars, P. and Le Bars, J. (1995) Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1156-1158.

Boyer, J., Baron, D. and Talalay, P. (1965) Purification and properties of a 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Biochemistry* **4**, 1825-1833.

Bursian, S.J., Aulerich, R.J., Cameron, J.K., Ames, N.K. and Steficek, B.A. (1992) Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate in reducing the toxicity of dietary zearalenone to mink. *J. Appl. Toxicol.* **12**, 85-90.

Bursian, S.J., Mitchell, R.R., Yamini, B., Fitzgerald, S.D., Murphy, P.A., Fernadez, G., Rottinghaus, G.E., Moran, L., Leefers, K. and Choi, I. (2004) Efficacy of a commercial mycotoxin binder in alleviating effects of ochratoxin A, fumonisin B-1, moniliformin and zearalenone in adult mink. *Vet. Human Toxicol.* **46**, 122-129.

Caloni, F., Spotti, M., Auerbach, H., Op den Camp, H., Gremmels, J.F. and Pompa, G. (2000) *In vitro* metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. *Vet. Res. Commun.* **24**, 379-387.

Calsamiglia, S. and Stern, M.D. (1995) A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim Sci.* **73**, 1459-1465.

Carson, M.S. and Smith, T.K. (1983) Role of bentonite in prevention of T-2 toxicosis in rats. *J. Anim. Sci.* **57**, 1498-1506.

Castaing, J. and Coudure, R. (2000) The use of an organic additive on crushed high moisture maize grain silage or low oxygen atmosphere high moisture whole maize grain: effect on the conservation and the performance of piglets and growing/finishing pigs. *Journees Rech. Porcine en France* **32**, 185-192.

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

Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B., Radomyska, W. and Wiewiorowska, M. (1982) Mycotoxins in cereal grain. 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung* **26**, 1-7.

Cheng, K.C., White, P.C. and Qin, K.N. (1991) Molecular cloning and expression of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol. Endocrinol.* **5**, 823-828.

Chourasia, H.K. (2001) Efficacy of ammonia in detoxification of fumonisin contaminated corn. *Indian J. Exp. Biol.* **39**, 493-495.

Clarke, A.J. and Dupont, C. (1992) O-acetylated peptidoglycan - Its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. *Can. J. Microbiol.* **38**, 85-91.

Colvin, B.M. and Harrison, L.R. (1992) Fumonisin induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia* **117**, 79-82.

Cook, J.E., Wilkinson, J.M. and Woolford, M.K. (1980) Addition of sodium bentonite to unwilted grass: effects on effluent production and nutritive value of silage. *Anim. Prod.* **30**, 467.

Cote, L.M., Dahlem, A.M., Yoshizawa, T., Swanson, S.P. and Buck, W.B. (1986a) Excretion of deoxynivalenol and its metabolite DOM-1, in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *Proceedings of 14th World Congress on Diseases of Cattle, Dublin* **2**, 717-722.

Cote, L.M., Dahlem, A.M., Yoshizawa, T., Swanson, S.P. and Buck, W.B. (1986b) Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **69**, 2416-2423.

Creppy, E.E. (2002) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* **127**, 19-28.

Dahlback, B., Hermansson, M., Kjelleberg, S. and Norkrans, B. (1981) The hydrophobicity of bacteria - an important factor in their initial adhesion at the air-water interface. *Arch. Microbiol.* **128**, 267-270.

Danicke, S., Gadeken, D., Ueberschar, K.H., Meyer, U. and Scholz, H. (2002) Effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* **56**, 245-261.

Danicke, S., Matthes, S., Halle, I., Ueberschar, K.H., Doll, S. and Valenta, H. (2003) Effects of graded levels of *Fusarium* toxin-contaminated wheat and of a detoxifying agent in broiler diets on performance, nutrient digestibility and blood chemical parameters. *Br. Poult. Sci.* **44**, 113-126.

Danicke, S., Ueberschar, K.H., Halle, I., Valenta, H. and Flachowsky, G. (2001) Excretion kinetics and metabolism of zearalenone in broilers in dependence on a detoxifying agent. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* **55**, 299-313.

Danicke, S., Valenta, H. and Doll, S. (2004a) On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* **58**, 169-180.

Danicke, S., Valenta, H., Doll, S., Ganter, A. and Flachowsky, G. (2004b) On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **114**, 141-157.

Danicke, S., Valenta, H., Gareis, M., Lucht, H.W. and von Reichenbach, H. (2005) On the effects of a hydrothermal treatment of deoxynivalenol (DON)-contaminated wheat in the presence of sodium metabisulphite ($Na_2S_2O_5$) on DON reduction and on piglet performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* **118**, 93-108.

Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E. and Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 159-184.

Dembinski, Z., Wieckowski, W., Jadzyn, B. and Mroz-Dembinska, S. (1985) Effect of the addition of bentonite manufactured in Poland on acidity and chemical composition of milk. *Med. Weter.* **41**, 750-753.

Deraedt, M. (2003) Ration des vaches laitières : influence de la part d'herbe et de maïs sur la quantité de correcteur azoté. Résultats sur 868 élevages. In *10ème Rencontres Recherches Ruminants*. p.388.

Devegowda, G. (2000) Mettre les mycotoxines sur la touche : d'où viennent les glucomannanes estérifiés. *Feeding Times* **4**, 12-14.

Diaz, D.E., Hagler, W.M., Hopkins, B.A. and Whitlow, L.W. (2003) Aflatoxin Binders I: *In vitro* binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* **156**, 223-226.

Diaz, G.J., Cortes, A. and Roldan, L. (2005) Evaluation of the efficacy of four feed additives against the adverse effects of T-2 toxin in growing broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* **14**, 226-231.

D'Mello, J.P.F., Placinta, C.M. and Macdonald, A.M.C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**, 183-205.

Doboszynska, T., Jarczyk, A. and Postek, A. (2004) Effect of zearalenone on morphological features of uterine horn walls in young gilts. *Med. Weter.* **60**, 274-277.

Doll, S., Danicke, S., Valenta, H. and Flachowsky, G. (2004) *In vitro* studies on the evaluation of mycotoxin detoxifying agents for their efficacy on deoxynivalenol and zearalenone. *Arch. Anim. Nutr.* **58**, 311-324.

Duvick, J. (2001) Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environ. Health Perspect.* **109**, 337-342.

Edrington, T.S., Kubena, L.F., Harvey, R.B. and Rottinghaus, G.E. (1997) Influence of a superactivated charcoal on the toxic effects of aflatoxin or T-2 toxin in growing broilers. *Poult. Sci.* **76**, 1205-1211.

El Sharkawy, S.H. (1991) Metabolism of T-2 toxin by *Mucor* and *Aspergillus* spp. *Alex. J. Pharm. Sci.* **5**, 165-171.

Elhimdy, B. and Pahlow, G. (1994) Epiphytic lactic acid bacteria (lab) in grass legume mixtures. *Landbauforschung Volkenrode* **44**, 256-260.

El-Hoshy, S.M. (1999) Occurrence of zearalenone in milk, meat and their products with emphasis on influence of heat treatments on its level. *Arch. Lebensmittelhyg.* **50**, 140-143.

El-Nezami, H., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002a) Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Addit. Contam.* **19**, 680-686.

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998) Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 321-326.

El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998b) Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Prot.* **61**, 466-468.

El-Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. (2000) Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1, from the chicken duodenum. *J. Food Prot.* **63**, 549-552.

El-Nezami, H., Mykkanen, H., Kankaanpaa, P., Suomalainen, T., Salminen, S. and Ahokas, J. (2000b) Ability of a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* to influence the faecal aflatoxin content in healthy Egyptian volunteers: a pilot clinical study. *Biosci. Microflora* **19**, 41-45.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2004) Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4577-4581.

El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002b) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3545-3549.

El-Nezami, H., Salminen, S.J. and Ahokas, J. (1996) Biologic control of food carcinogens with use of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today* **31**, 41-42.

El-Nezami, H.S., Chrevatidis, A., Auriola, S., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002a) Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*. *Food Addit. Contam.* **19**, 680-686.

El-Nezami, H.S., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H. (2002b) Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-Grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative alpha-zearalenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3545-3549.

El-Nezami, H.S., Polychronaki, N.N., Ma, J., Zhu, H.L., Ling, W.H., Salminen, E.K., Juvonen, R.O., Salminen, S.J., Poussa, T. and Mykkanen, H.M. (2006) Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 1199-1203.

Ely, L.O., Sudweeks, E.M. and Moon, N.J. (1981) Inoculation with *Lactobacillus plantarum* of alfalfa, corn, sorghum, and wheat silages. *J. Dairy Sci.* **64**, 2378-2387.

Engelhardt, G., Zill, G., Wohner, B. and Wallnofer, P.R. (1988) Transformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften* **75**, 309-310.

Engels, R. and Kraemer, J. (1996) Incidence of *Fusaria* and occurrence of selected *Fusarium* mycotoxins on *Lolium* spp. in Germany. *Mycological Res.* **12**, 31-40.

Eriksen, G.S. (2003) Thèse, metabolism and toxicity of trichothecenes. In *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae - Agraria*. Sveriges Lantbruksuniversitet (Swedish University of Agricultural Sciences), Alnarp Sweden.p.38.

Eriksen, G.S. and Pettersson, H. (2004) Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **114**, 205-239.

Eriksen, G.S., Pettersson, H. and Lindberg, J.E. (2003) Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* **57**, 335-345.

Eriksen, G.S., Pettersson, H. and Lundh, T. (2004) Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 619-624.

Everett, D.J., Perry, C.J., Scott, K.A., Martin, B.W. and Terry, M.K. (1987) Estrogenic potencies of resorcylic acid lactones and 17 beta-estradiol in female rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **20**, 435-443.

Fernandes, C.F., Shahani, K.M. and Amer, M.A. (1987) Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 343-356.

Fernandez-Surumay, G., Osweiler, G.D., Yaeger, M.J., Hauck, C.C., Hendrich, S. and Murphy, P.A. (2004) Glucose reaction with fumonisin B-1 partially reduces its toxicity in swine. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7732-7739.

Filya, I. (2003) The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *J. Dairy Sci.* **86**, 3575-3581.

Fitzpatrick, D.W., Picken, C.A., Murphy, L.C. and Buhr, M.M. (1989) Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha -zearalenol and beta -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp. Biochem. Physiol. C* **94**, 691-694.

Franceschi, S., Bidoli, E., Baron, A.E. and la Vecchia, C. (1990) Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy. *J. Natl. Cancer Inst*. **82**, 1407-1411.

Fuchs, E., Binder, E.M., Heidler, D. and Krska, R. (2002) Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Addit. Contam.* **19**, 379-386.

Fujita, M. and Yoshizawa, T. (1989) Induction of phytoalexins by various mycotoxins and metabolism of mycotoxins in sweet potato root tissues. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **30**, 501-505.

Fujita, M. and Yoshizawa, T. (1990) Metabolism of deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in sweet potato root tissues. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **31**, 474-478.

Galtier, P. (1999) Biotransformation and fate of mycotoxins. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* **18**, 295-312.

Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A., Chies, L. and Galvano, M. (1998) Activated carbons: *In vitro* affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. *J. Food Prot.* **61**, 469-475.

Gardner, H.K., Koltun, S.P., Dollear, F.G. and Rayner, E.T. (1971) Inactivation of aflatoxins in peanut and cottonseed meals by ammoniation. *J Am. Oil Chem. Soc.* **48**, 70-73.

Gareis, M., Bauer, J. and Gedek, B. (1987) On the metabolism of the mycotoxin deoxynivalenol in the isolated perfused rat liver. *Mycotox. Res.* **3**, 25–32.

Gareis, M., Bauer, J., Thiem, J., Plank, G., Grabley, S. and Gedek, B. (1990) Cleavage of zearalenone-glycoside, a "masked" mycotoxin during digestion in swine. *J. Vet. Med. B* **37**, 236-240.

Geary, T.M., Brooks, P.H., Beal, J.D. and Campbell, A. (1999) Effect on weaner pig performance and diet microbiology of feeding a liquid diet acidified to pH 4 with either lactic acid or through fermentation with *Pediococcus acidilactici*. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 633-640.

Geary, T.M., Brooks, P.H., Morgan, D.T., Campbell, A. and Russell, P.J. (1996) Performance of weaner pigs fed *ad libitum* with liquid feed at different dry matter concentrations. *J. Sci. Food Agric.* **72**, 17-24.

Ghuysen, J.M. (1991) Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 37-67.

Gibson, T., Stirling, A.C., Keddie, R.M. and Rosenberger, R.F. (1958) Bacteriological changes in silage made at controlled temperatures. *J. Gen. Microbiol.* **19**, 112-129.

Gilliland, S.E. (1990) Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **7**, 175-188.

Goldblatt, L.A. and Dollear, F.G. (1979) Modifying mycotoxin contamination in feeds - use of mold inhibitors, ammoniation, roasting. *Interactions of mycotoxins in animal production. Proceedings of a Symposium, July 13, 1978, Michigan State University.*, 167-184.

Gollop, N., Zakin, V. and Weinberg, Z.G. (2005) Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 662-666.

Gourama, H. (1997) Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebensm. Wiss. Technol.* **30**, 279-283.

Gourama, H. and Bullerman, L.B. (1995) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **58**, 1249-1256.

Gratz, S., El-Nezami, H. and Mykkanen, H. (2003) Probiotic bacteria retard the *ex vivo* absorption of aflatoxin B-1 from chick duodenum. *Toxicology* **191**, 50-50.

Gratz, S., Mykkanen, H. and El-Nezami, H. (2005) Aflatoxin B-1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *In vitro* versus *ex vivo*. *J. Food Prot.* **68**, 2470-2474.

Gratz, S., Mykkanen, H., Ouwehand, A.C., Juvonen, R., Salminen, S. and El-Nezami, H. (2004) Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6306-6308.

Gratz, S., Taubel, M., Juvonen, R.O., Viluksela, M., Turner, P.C., Mykkanen, H. and El-Nezami, H. (2006) *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7398-7400.

Guerre, P. (2000) Interest of the treatments of raw materials and usage of adsorbents to decontaminate animal food containing mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* **151**, 1095-1106.

Haard, N.F., Odunfa, S.A., Lee, C., Quintero-Ramirez, R., Lorence-Quinones, A. and Wacher-Radarte, C. (1999) Fermented cereals. A global perspective. In *FAO Agricultural Services Bulletin n°138*.p.114.

Hagler, W.M., Jr. (1991) Potential for detoxification of mycotoxin-contaminated commodities. In *Mycotoxins, cancer, and health.* Louisiana State University Press, Baton Rouge USA, pp.253-269.

Hammer, P., Bluthgen, A. and Walte, H.G. (1996) Carry-over of fumonisin B1 into the milk of lactating cows. *Milchwissenschaft* **51**, 691-695.

Harrison, J.H., Soderlund, S.D. and Loney, K.A. (1989) Effect of inoculation rate of selected strains of lactic acid bacteria on fermentation and *in vitro* digestibility of grass-legume forage. *J. Dairy Sci.* **72**, 2421-2426.

Haskard, C., Binnion, C. and Ahokas, J. (2000) Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem.-Biol. Interact.* **128**, 39-49.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S. and K. D. Peltonen, S.S., and J. T. Ahokas (1998) Sequestration of aflatoxin B1 by probiotic strains: binding capacity and localisation. *Rev. Med. Vet.* **149**, 571.

Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S. and Ahokas, J.T. (2001) Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3086-3091.

He, P., Young, L.G. and Forsberg, C. (1992) Microbial transformation of deoxynivalenol (vomitoxin). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3857-3863.

Hedman, R. and Pettersson, H. (1997) Transformation of nivalenol by gastrointestinal microbes. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* **50**, 321-329.

Higa, A., Kimura, M., Mimori, K., Ochiai-Fukuda, T., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Nishiuchi, T., Igawa, T., Fujimura, M., Hamamoto, H., Usami, R. and Yamaguchi, I. (2003) Expression in cereal plants of genes that inactivate *Fusarium* mycotoxins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 914-918.

Hoffmann, F., Sotriffer, C., Evers, A., Xiong, G.M. and Maser, E. (2006) Structural aspects of oligomerization in 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: New approaches for efficient protein design. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 12* pp.308-314.

Hojberg, O., Canibe, N., Poulsen, H.D., Hedemann, M.S. and Jensen, B.B. (2005) Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2267-2277.

Hoogenboom, L.A.P., Tulliez, J., Gautier, J.P., Coker, R.D., Melcion, J.P., Nagler, M.J., Polman, T.H.G. and Delort-Laval, J. (2001) Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Addit. Contam.* **18**, 47-58.

Hosoda, M., Hashimoto, H., He, F., Yamazaki, K. and Hosono, A. (1997) Inhibitory effect of milk cultured with *Lactobacillus* strains on the aflatoxin mutagenicity. *Anim. Sci. Technol.* **68**, 555-562.

Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M. and Hosono, A. (1992) Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. *J. Dairy Sci.* **75**, 976-981.

Huang, C.H., Qiao, S.Y., Li, D.F., Piao, X.S. and Ren, J.P. (2004) Effects of *Lactobacilli* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **17**, 401-409.

Huff, W.E. and Hagler, W.M., Jr. (1985) Density segregation of corn and wheat naturally contaminated with aflatoxin, deoxynivalenol and zearalenone. *J. Food Prot.* **48**, 416–420.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. and Dutler, H. (2001) Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* **122**, 179-188.

Hwang, C.C., Chang, Y.H., Hsu, C.N., Hsu, H.H., Li, C.W. and Pon, H.I. (2005) Mechanistic roles of Ser-114, Tyr-155, and Lys-159 in 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* **280**, 3522-3528.

IARC (1993) Some naturally occuring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* **56**, 397-433.

Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M. and Penning, T.M. (1997a) Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* **326**, 625-636.

Jez, J.M., Flynn, T.G. and Penning, T.M. (1997b) A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 639-647.

Jones, B.A., Muck, R.E. and Ricke, S.C. (1991) Selection and application of *Streptococcus bovis* as a silage inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3000-3005.

Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003–6013.

Kallberg, Y., Oppermann, U., Jornvall, H. and Persson, B. (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) - Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4409-4417.

Kallela, K. and Vasenius, L. (1982) The effects of rumen fluid on the content of zearalenone in animal fodder. *Nord. Vet. Med.* **34**, 336-339.

Kankaanpaa, P., Tuomola, E., El-Nezami, H., Ahokas, J. and Salminen, S.J. (2000) Binding of aflatoxin B1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. *J. Food Prot.* **63**, 412-414.

Karlovsky, P. (1999) Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production. *Nat. Toxins* **7**, 1-23.

Khuntia, A. and Chaudhary, L.C. (2002) Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **15**, 188-194.

Kiessling, K.H. and Pettersson, H. (1978) Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)* **43**, 285-290.

Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, K. and Olsen, M. (1984) Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1070-1073.

Kim, E.K., Maragos, C.M. and Kendra, D.F. (2004) Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn silage. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 196-200.

King, R.R., McQueen, R.E., Levesque, D. and Greenhalgh, R. (1984) Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1181-1183.

Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239-256.

Kollarczik, B., Gareis, M. and Hanelt, M. (1994) *In vitro* transformation of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone by the normal gut microflora of pigs. *Nat. Toxins* **2**, 105-110.

Krause, D.O., Smith, W.J.M., Conlan, L.L., Gough, J.M., Anna Williamson, M. and McSweeney, C.S. (2003) Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S rDNA. *Microbiology* **149**, 57-65.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Corrier, D.E., Phillips, T.D. and Rottinghaus, G.E. (1990) Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poult. Sci.* **69**, 1078-1086.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Elissalde, M.H., Yersin, A.G., Phillips, T.D. and Rottinghaus, G.E. (1993) Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxyscirpenol. *Poult. Sci.* **72**, 51-59.

Kung, J., L., Stokes, M.R. and Lin, C.J. (2003) Silage additives. In *Silage Science and Technology* eds. Buxton, D.R., Muck, R.E. and Harrison, J.H. Am. Soc. Agronomy, Inc. Madison, WI.p.305–360.

Lahtinen, S.J., Haskard, C.A., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. and Ahokas, J.T. (2004) Binding of aflatoxin B-1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Addit. Contam.* **21**, 158-164.

Langston, C.W. and Bouma, C. (1960) A study of the microorganisms from grass silage. II. The *Lactobacilli*. *Appl. Microbiol.* **8**, 223-234.

Larsen, J.C., Hunt, J., Perrin, I. and Ruckenbauer, P. (2004) Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicol. Lett.* **153**, 1-22.

Le Bars, J. and Le Bars, P. (1996) Recent acute and subacute mycotoxicoses recognized in France. *Vet. Res.* **27**, 383-394.

Lemke, S.L., Mayura, K., Ottinger, S.E., McKenzie, K.S., Wang, N., Fickey, C., Kubena, L.F. and Phillips, T.D. (1999) Assessment of the estrogenic effects of zearalenone after treatment with ozone utilizing the mouse uterine weight bioassay. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **56**, 283-295.

Lemke, S.L., Mayura, K., Reeves, W.R., Wang, N.Y., Fickey, C. and Phillips, T.D. (2001a) Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **62**, 243-258.

Lemke, S.L., Ottinger, S.E., Ake, C.L., Mayura, K. and Phillips, T.D. (2001b) Deamination of fumonisin B-1 and biological assessment of reaction product toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 11-15.

Lepom, P., Baath, H. and Knabe, O. (1988) Occurrence of *Fusarium* species and their mycotoxins in maize. 3. The influence of silaging on the zearalenone content of CCM maize. *Arch. Anim. Nutr.* **38**, 817-823.

Lew, H., Adler, A., Brodacz, W. and Edinger, W. (1997) Zum Vorkommen von Nivalenol in Getreide und Mais. *Mycotoxin Res.* **19**, 6-9.

Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., Hart, R.A., Dickerson, J.T., Feyerherm, A.M. and Aimutis, W.R. (1992a) Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *J. Dairy Sci.* **75**, 2484-2493.

Lin, C.J., Bolsen, K.K., Brent, B.E. and Fung, D.Y.C. (1992b) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 375-387.

Liras, P., Kasparian, S.S. and Umbreit, W.W. (1975) Enzymatic transformation of morphine by hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **30**, 650-656.

Lortal, S., Rouault, A., Cesselin, B. and Sleytr, U.B. (1993) Paracrystalline surface layers of dairy *Propionibacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2369-2374.

Lu, Y., Clifford, L., Hauck, C.C., Hendrich, S., Osweiler, G. and Murphy, P.A. (2002) Characterization of fumonisin B-1-glucose reaction kinetics and products. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4726-4733.

MacDonald, I.A., Jellett, J.F., Mahony, D.E. and Holdeman, L.V. (1979) Bile salt 3 alpha- and 12 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from *Eubacterium lentum* and related organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 992-1000.

Macdonald, I.A., Meier, E.C., Mahony, D.E. and Costain, G.A. (1976) 3alpha-, 7alpha- and 12alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activities from *Clostridium perfringens*. *Biochim. Biophys. Acta* **450**, 142-153.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R. and Fink-Gremmels, J. (2006a) Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet. J.* **172**, 96-102.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R.F. and Fink-Gremmels, J. (2005) Enzyme kinetics of zearalenone biotransformation: pH and cofactor effects. *Arch. Toxicol.* **79**, 547-553.

Mannon, J. and Johnson, E. (1985) Fungi down on the farm. *New Scientist* **1445**, 12-16.

Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G. and Lugt, J.J. (1988) Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **55**, 197-203.

Marcus, P.I. and Talalay, P. (1956) Induction and purification of alpha- and beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **218**, 661-674.

Maser, E., Mobus, E. and Xiong, G.M. (2000) Functional expression, purification, and characterization of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 622-628.

Maser, E., Oppermann, U.C.T., Bannenberg, G. and Netter, K.J. (1992) Functional and immunological relationships between metyrapone reductase from mouse liver microsomes and 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *FEBS Lett.* **297**, 196-200.

Maser, E., Xiong, G.M., Grimm, C., Ficner, R. and Reuter, K. (2001) 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. *Chem.-Biol. Interact.* **130**, 707-722.

Masimango, N., Remack, J. and Ramaut, J. (1979) Elimination of aflatoxin B1 from contaminated substrates by swelling clays. *Ann. Nutr. Aliment.* **33**, 137-147.

Matsushima, T., Okamoto, E., Miyagawa, E., Matsui, Y., Shimizu, H. and Asano, K. (1996) Deacetylation of diacetoxyscirpenol to 15-acetoxyscirpenol by rumen bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**, 225-234.

Matsuura, Y. and Yoshizawa, T. (1985) Conversion of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, by brewing microorganisms. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **26**, 24-28.

McDonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E. (1991) The biochemistry of silage, second edition. In *The biochemistry of silage.*

McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Mayura, K., Bailey, R.H., Miller, D.R., Rogers, T.D., Norred, W.P., Voss, K.A., Plattner, R.D., Kubena, L.F. and Phillips, T.D. (1997) Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 807-820.

Megharaj, M., Garthwaite, I. and Thiele, J.H. (1997) Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 329-333.

Merrill, A.H., Sullards, M.C., Wang, E., Voss, K.A. and Riley, R.T. (2001) Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**, 283-289.

Messner, P., Allmaier, G., Schaffer, C., Wugeditsch, T., Lortal, S., Konig, H., Niemetz, R. and Dorner, M. (1997) Biochemistry of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 25-46.

Metzler, B., Bauer, E. and Mosenthin, R. (2005) Microflora management in the gastrointestinal tract of piglets. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **18**, 1353-1362.

Mikkelsen, L.L. and Jensen, B.B. (1998) Performance and microbial activity in the gastrointestinal tract of piglets fed fermented liquid feed at weaning. *J. Anim. Feed Sci.* **7**, 211-215.

Mikkelsen, L.L., Naughton, P.J., Hedemann, M.S. and Jensen, B.B. (2004) Effects of physical properties of feed on microbial ecology and survival of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in the pig gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3485-3492.

Miller, J.D., Young, J.C. and Sampson, D.R. (1985) Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals. *J. Phytopathol.* **113**, 359-367.

Mills, J.T. (1989) Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J. Food Prot.* **52**.

Mirocha, C.J., Abbas, H.K., Treeful, L. and Bean, G. (1988) T-2 toxin and diacetoxyscirpenol metabolism by *Baccharis* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2277-2280.

Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Robison, T.S. (1981) Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet. Toxicol.* **19**, 25-30.

Mobus, E. and Maser, E. (1998) Molecular cloning overexpression, and characterization of steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni* - A novel member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* **273**, 30888-30896.

Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. and Prillinger, H. (2004) *Trichosporon mycotoxinivorans* sp *nov*., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 661-671.

Moon, N.J., Moon, L.C., Ely, L.O. and Parker, J.A. (1981) Lactic acid bacteria active during the fermentation of wheat silage in small scale silos. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 248-250.

Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Wang, Y. and Yang, W.Z. (2001) Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. *J. Anim Sci.* **79**, 1621-1630.

Morotomi, M. and Mutai, M. (1986) *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**, 195-201.

Motelin, G.K., Haschek, W.M., Ness, D.K., Hall, W.F., Harlin, K.S., Schaeffer, D.J. and Beasley, V.R. (1994) Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. *Mycopathologia* **126**, 27-40.

Muck, R.E. (1993) The role of silage additives in making high quality silage. In *Silage Production from Seed to Animal* ed. Syracuse, N.N.-., Northeast Regional Agricultural Engineering Service.p.106–116.

Muller, M., Muller, T. and Seyfarth, W. (1993) Changes of epiphytic microflora during wilting of grasses and possible effects on the ensiling success. *Agribiol. Res.* **46**, 28-39.

Muller, T. and Seyfarth, G. (1993) Sensitivity of plant associated lactic acid bacteria to antibiotics and mycotoxins. *Zentralbl. Mikrobiol.* **148**, 103-108.

Nagendra, S. and Wu, X. (1999) Aflatoxin B1 binding abilities of probiotic bacteria. *Biosci. Microflora* **18**, 43-48.

Niderkorn, V., Boudra, H. and Morgavi, D.P. (2006) Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 849-856.

Nilsson, G. and Nilsson, P.E. (1956) Silage studies. IV. The microflora on the surface of some fodder plants at different stages of maturity. *Arch. Microbiol.* **24**, 412-422.

Nishino, N., Wada, H., Yoshida, M. and Shiota, H. (2004) Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* **87**, 2563-2570.

Norred, W.P., Voss, K.A., Bacon, C.W. and Riley, R.T. (1991) Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 815-819.

Oatley, J.T., Rarick, M.D., Ji, G.E. and Linz, J.E. (2000) Binding of aflatoxin B-1 to *Bifidobacteria in vitro*. *J. Food Prot.* **63**, 1133-1136.

Oldenburg, E., Lepschy, J., Valenta, H. and Weissbach, F. (1996) Fusarientoxine in Silomais. Abhängigkeit von Sorte und Standort. *Mycotoxin Res.* **12**, 174-179.

Olsen, M. (1989) Metabolism of zearalenone in farm animals. In *Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity.* Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam Netherlands, pp.167-177.

Olsen, M., Malmlof, K., Pettersson, H., Sandholm, K. and Kiessling, K.H. (1985) Plasma and urinary levels of zearalenone and alpha-zearalenol in a prepubertal gilt fed zearalenone. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **56**, 239-243.

Olsen, M., Pettersson, H. and Kiessling, K.H. (1981) Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha -hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **48**, 157-161.

Olsen, M., Pettersson, H., Sandholm, K., Visconti, A. and Kiessling, K.H. (1987) Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **25**, 681-683.

Oppermann, U.C.T., Belai, I. and Maser, E. (1996) Antibiotic resistance and enhanced insecticide catabolism as consequences of steroid induction in the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **58**, 217-223.

Oppermann, U.C.T. and Maser, E. (1996) Characterization of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur. J. Biochem.* **241**, 744-749.

Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I. and Accensi, F. (2005) Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Addit. Contam.* **22**, 354-360.

Pahlow, G., Muller, T. and Lier, D. (1995) The influence of harvesting method on the recovery of epiphytic lactic acid bacteria of fodder crops. *Wirtschaftseigene Futter* **41**, 306-326.

Palencia, E., Torres, O., Hagler, W., Meredith, F.I., Williams, L.D. and Riley, R.T. (2003) Total fumonisins are reduced in tortillas using the traditional nixtamalization method of mayan communities. *J. Nutr.* **133**, 3200-3203.

Parent-Massin, D. and Parchment, R.E. (1998) Haematotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* **149**, 591-598.

Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L. and Pohland, A.E. (1988) Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 685-703.

Pasti, M.A. (2006) *Fusarium*-toxins: the EU is too demanding. *Informatore Agrario* **62**, 56-57.

Patterson, R. and Young, L.G. (1993) Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate, screening and dilution in reducing the effects of mold contaminated corn in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **73**, 615-624.

Pearson, T.C., Doster, M.A. and Michailides, T.J. (2001) Automated detection of pistachio defects by machine vision. *Appl. Eng. Agric.* **17**, 729-732.

Pei, S.C., Lee, W.J. and Kim, S.S. (2005) Reduction of deoxynivalenol in barley by chemical treatments and malting. *Food Sci. Biotechnol.* **14**, 823-827.

Peltonen, K., Kankaanpaa, P., El-Nezami, H., Salminen, S. and Ahokas, J. (1998) Ability of cheese starter culture strains to bind aflatoxin, a food carcinogen. *Aust. J. Dairy Technol.* **53**, 137.

Peng, S., Dong, J. and Yang, J. (1996) Studies on relationship between toxicity of trichothecene toxin T-2 and its structure. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **30**, 141-143.

Persson, B., Krook, M. and Jornvall, H. (1991) Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* **200**, 537-543.

Petkova, E., Venkov, T., Chushkov, P., Encheva, I. and Poshtakov, E. (1981) Biochemical and hematological indices from the use of a bulgarben preparation in digestive disorders in calves. *Vet. Med. Nauki* **18**, 28-33.

Phillips, T.D., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Taylor, D.R. and Heidelbaugh, N.D. (1988) Hydrated sodium calcium aluminosilicate: a high affinity sorbent for aflatoxin. *Poult. Sci.* **67**, 243-247.

Pittet, A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in food and feed-an update review. *Rev. Med. Vet.* **149**, 479-492.

Piva, A., Casadei, G., Pagliuca, G., Cabassi, E., Galvano, F., Solfrizzo, M., Riley, R.T. and Diaz, D.E. (2005) Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B-1 when fed to weanling piglets. *J. Anim. Sci.* **83**, 1939-1947.

Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. (1999) A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **78**, 21-37.

Poapolathep, A., Sugita-Konishi, Y., Doi, K. and Kumagai, S. (2003) The fates of trichothecene mycotoxins, nivalenol and fusarenon-X, in mice. *Toxicon* **41**, 1047-1054.

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glossl, J., Luschnig, C. and Adam, G. (2003) Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 47905-47914.

Prelusky, D.B., Hartin, K.E., Trenholm, H.L. and Miller, J.D. (1988) Pharmacokinetic fate of 14C-labeled deoxynivalenol in swine. *Fundam. Appl. Toxicol.* **10**, 276-286.

Prelusky, D.B., Savard, M.E. and Trenholm, H.L. (1995) Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration. *Nat. Toxins* **3**, 389-394.

Prelusky, D.B., Scott, P.M., Trenholm, H.L. and Lawrence, G.A. (1990) Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B* **25**, 87-103.

Prelusky, D.B. and Trenholm, H.L. (1992) Nonaccumulation of residues in swine tissue following extended consumption of deoxynivalenol contaminated diets. *J. Food Sci.* **57**, 801-802.

Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Lawrence, G.A. and Scott, P.M. (1984) Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. *J. Environ. Sci. Health Part B* **19**, 593-609.

Prelusky, D.B., Trenholm, H.L. and Savard, M.E. (1994) Pharmacokinetic fate of 14C-labelled fumonisin B1 in swine. *Nat. Toxins* **2**, 73-80.

Prelusky, D.B., Veira, D.M., Trenholm, H.L. and Foster, B.C. (1987) Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. *J. Environ. Sci. Health Part B* **22**, 125-148.

Prelusky, D.B., Veira, D.M., Trenholm, H.L. and Hartin, K.E. (1986) Excretion profiles of the mycotoxin deoxynivalenol, following oral and intravenous administration to sheep. *Fundam. Appl. Toxicol.* **6**, 356-363.

Prohaszka, L. (1991) Reduction of *Salmonella* infection by feeding grain maize silage in pigs. *Magy. Allatorvosok Lapja* **46**, 218-221.

Prohaszka, L., Jayarao, B.M., Fabian, A. and Kovacs, S. (1990) The role of intestinal volatile fatty acids in the *Salmonella* shedding of pigs. *J. Vet. Med. B* **37**, 570-574.

Rainey, M.R., Tubbs, R.C., Bennett, L.W. and Cox, N.M. (1990) Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts. *J. Anim. Sci.* **68**, 2015-2022.

Rajendran, R. and Ohta, Y. (1998) Binding of heterocyclic amines by lactic acid bacteria from miso, a fermented Japanese food. *Can. J. Microbiol.* **44**, 109-115.

Raju, M.V.L.N. and Devegowda, G. (2000) Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *Br. Poult. Sci.* **41**, 640-650.

Raman, M. and Sharma, D.D. (1998) *In vitro* evaluation of different probiotics as feed supplement. *Indian J. Dairy Sci.* **51**, 357-362.

Ramos, A.J., FinkGremmels, J. and Hernandez, E. (1996) Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.* **59**, 631-641.

Raymond, S.L., Smith, T.K. and Swamy, H. (2003) Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* **81**, 2123-2130.

Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Vanschalkwyk, D.J. (1992) Fusarium-Moniliforme and Fumonisins in Corn in Relation to Human Esophageal Cancer in Transkei. *Phytopathology* **82**, 353-357.

Richardson, K.E. and Hamilton, P.B. (1990) Comparative toxicity of scirpentriol and its acetylated derivatives. *Poult. Sci.* **69**, 397-402.

Riley, R.T., An, N.H., Showker, J.L., Yoo, H.S., Norred, W.P., Chamberlain, W.J., Wang, E., Merrill, A.H., Jr., Motelin, G. and Beasley, V.R. (1993) Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **118**, 105-112.

Riley, R.T., Enongene, E., Voss, K.A., Norred, W.P., Meredith, F.I., Sharma, R.P., Spitsbergen, J., Williams, D.E., Carlson, D.B. and Merrill, A.H. (2001) Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **109**, 301-308.

Riley, R.T., Voss, K.A., Norred, W.P., Sharma, R.P., Wang, E. and Merrill, A.H. (1998) Fumonisins: mechanism of mycotoxicity. *Rev. Med. Vet.* **149**, 617-626.

Riley, R.T., Voss, K.A., Yoo, K.S., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. (1994) Mechanism of fumonisin toxicity and carcinogenesis. *J. Food Prot.* **57**, 638-645.

Robison, T.S., Mirocha, C.J., Kurtz, H.J., Behrens, J.C., Chi, M.S., Weaver, G.A. and Nystrom, S.D. (1979) Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. *J. Dairy Sci.* **62**, 637-641.

Rocha, O., Ansari, K. and Doohan, F.M. (2005) Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Addit. Contam.* **22**, 369-378.

Rotter, B.A., Prelusky, D.B. and Pestka, J.J. (1996) Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* **48**, 1-34.

Rotter, R.G., Rotter, B.A., Thompson, B.K., Prelusky, D.B. and Trenholm, H.L. (1995) Effectiveness of density segregation and sodium carbonate treatment on the detoxification of *Fusarium* contaminated corn fed to growing pigs. *J. Sci. Food Agric.* **68**, 331-336.

Roybal, J.E., Munns, R.K., Morris, W.J., Hurlbut, J.A. and Shimoda, W. (1988) Determination of zeranol/zearalenone and their metabolites in edible animal tissue by liquid chromatography with electrochemical detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 263-271.

Ruser, B. (1989) The incidence of lactic acid bacteria on forage crops. *Landbauforschung Volkenrode* **39**, 32-39.

Russell, P.J., Geary, T.M., Brooks, P.H. and Campbell, A. (1996) Performance, water use and effluent output of weaner pigs fed *ad libitum* with either dry pellets or liquid feed and the role of microbial activity in the liquid feed. *J. Sci. Food Agric.* **72**, 8-16.

Salawu, M.B., Warren, E.H. and Adesogan, A.T. (2001) Fermentation characteristics, aerobic stability and ruminal degradation of ensiled pea/wheat bi-crop forages treated with two microbial inoculants, formic acid or quebracho tannins. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 1263-1268.

Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A. (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* **192**, 1096-1097.

Saunders, D.S., Meredith, F.I. and Voss, K.A. (2001) Control of fumonisin: effects of processing. *Environ. Health Perspect.* **109**, 333-336.

SCEES (campagne 2005) http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/saa2006T3a-2.pdf.

Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., Nitsch, S., Mohnl, M., Taubel, M., Loibner, A.P., Braun, R. and Binder, E.M. (2003) Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycotox. Res.* **19**, 124-128.

Schatzmayr, G., Zehner, F., Taubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A.P. and Binder, E.M. (2006) Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 543-551.

Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477.

Schneweis, I., Meyer, K., Ritzmann, M., Hoffmann, P., Dempfle, L. and Bauer, J. (2005) Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs. *Arch. Anim. Nutr.* **59**, 155-163.

Scott, P.M. (1998) Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* **149**, 543-548.

Scott, P.M., Delgado, T., Prelusky, D.B., Trenholm, H.L. and Miller, J.D. (1994) Determination of fumonisins in milk. *J. Environ. Sci. Health Part B* **29**, 989-998.

Seale, D.R. (1986) Bacterial inoculants as silage additives. *J. Appl. Bacteriol.* **61**, 9-26.

Seeling, K. and Danicke, S. (2005) Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition. A review. *J. Anim. Feed Sci.* **14**, 3-40.

Sewald, N., Vongleissenthall, J.L., Schuster, M., Muller, G. and Aplin, R.T. (1992) Structure elucidation of a plant metabolite of 4-desoxynivalenol. *Tetrahedron Asymmetry* **3**, 953-960.

Sharp, R., Hazlewood, G.P., Gilbert, H.J. and Odonnell, A.G. (1994) Unmodified and recombinant strains of *Lactobacillus plantarum* are rapidly lost from the rumen by protozoal predation. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 110-117.

Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Leggott, N.L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H. and Safavi, N. (2000) Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1860-1864.

Shephard, G.S., vanderWesthuizen, L., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O. and vanSchalkwyk, D.J. (1996) Disruption of sphingolipid metabolism in non-human primates consuming diets of fumonisin-containing *Fusarium moniliforme* culture material. *Toxicon* **34**, 527-534.

Shier, W.T. (1998) Estrogenic mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* **149**, 599-604.

Shier, W.T. (2000) The fumonisin paradox: A review of research on oral bioavailability of fumonisin B-1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Toxicol. Toxin. Rev.* **19**, 161-187.

Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W. and Mirocha, C.J. (2001) Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon* **39**, 1435-1438.

Shima, J., Takase, S., Takahashi, Y., Iwai, Y., Fujimoto, H., Yamazaki, M. and Ochi, K. (1997) Novel detoxification of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol by a soil bacterium isolated by enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3825-3830.

Shockman, G.D. and Barren, J.F. (1983) Structure, function, and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 501-527.

Shon, K.S., Hong, J.W., Kwon, O.S., Min, B.J., Lee, W.B., Kim, I.H., Park, Y.H. and Lee, I.S. (2005) Effects of *Lactobacillus reuteri*-based direct-fed microbial supplementation for growing-finishing pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* **18**, 370-374.

Shreeve, B.J., Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A. (1979) The carry-over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. *Food Cosmet. Toxicol.* **17**, 151-152.

Skalhegg, B.A. (1975) 3 -alpha hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*: kinetic properties with NAD and its thionicotinamide analogue. *Eur. J. Biochem.* **50**, 603-609.

Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D. and Sara, M. (1993) Crystalline bacteria cell surface layers. *Mol. Microbiol.* **10**, 911-916.

Smith, J.F. and Morris, C.A. (2006) Review of zearalenone studies with sheep in New Zealand. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **66**, 306-310.

Smith, T.K. (1982) Dietary influences on excretory pathways and tissue residues on zearalenone and zearalenols in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **60**, 1444-1449.

Solfrizzo, M., Visconti, A., Avantaggiato, G., Torres, A. and Chulze, S. (2001) *In vitro* and *in vivo* studies to assess the effectiveness of cholestyramine as a binding agent for fumonisins. *Mycopathologia* **151**, 147-153.

Sreekumar, O. and Hosono, A. (1998) Antimutagenicity and the influence of physical factors in binding *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium longum* cells to amino acid pyrolysates. *J. Dairy Sci.* **81**, 1508-1516.

Stokes, M.R. and Chen, J. (1994) Effects of an enzyme inoculant mixture on the course of fermentation of corn-silage. *J. Dairy Sci.* **77**, 3401-3409.

Styriak, I. and Conkova, E. (2002) Microbial binding and biodegradation of mycotoxins. *Vet. Human Toxicol.* **44**, 358-361.

Suzuki, K., Ueda, S., Sugiyama, M. and Imamura, S. (1993) Cloning and expression of a *Pseudomonas* 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in *Escherichia Coli*. *Gene* **130**, 137-140.

Swamy, H., Smith, T.K., MacDonald, E.J., Boermans, H.J. and Squires, E.J. (2002) Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.* **80**, 3257-3267.

Swanson, S.P., Helaszek, C., Buck, W.B., Rood, H.D., Jr. and Haschek, W.M. (1988) The role of intestinal microflora in the metabolism of trichothecene mycotoxins. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 823-829.

Swanson, S.P., Nicoletti, J., Rood, H.D., Jr., Buck, W.B., Cote, L.M. and Yoshizawa, T. (1987) Metabolism of three trichothecene mycotoxins, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and deoxynivalenol, by bovine rumen microorganisms. *J. Chromatogr.* **414**, 335-342.

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

Takahashi-Ando, N., Tokai, T., Hamamoto, H., Yamaguchi, I. and Kimura, M. (2005) Efficient decontamination of zearalenone, the mycotoxin of cereal pathogen, by transgenic yeasts through the expression of a synthetic lactonohydrolase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 838-844.

Tanabe, T., Otani, H. and Hosono, A. (1991) Binding of mutagens with cell wall peptidoglycan of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* T-180. *Milchwissenschaft* **46**, 622-625.

Tashiro, F. (2000) Mode of action of zearalenone, an estrogenic mycotoxin. *Mycotoxins* **50**, 105-110.

Thibault, N., Burgat, V. and Guerre, P. (1997) Fumonisins: Properties, sources and toxicity. *Rev. Med. Vet.* **148**, 369-388.

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

Thomas, F. (2005) Fusarioses et mycotoxines. L'état des connaissances. *Techniques culturales simplifiées* **n°32**.

Thompson, W.L. and Wannemacher, R.W., Jr. (1986) Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality. *Toxicon* **24**, 985-994.

Thyagaraja, N. and Hosono, A. (1994) Binding properties of lactic acid bacteria from idly towards food borne mutagens. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 805-809.

Towers, N.R. and Sprosen, J.M. (1993) Zearalenone-induced infertility in sheep and cattle in New Zealand. *NZ Vet. J.* **41**, 223-224.

Toyoda, H., Hashimoto, H., Utsumi, R., Kobayashi, H. and Ouchi, S. (1988) Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* **78**, 1307-1311.

Toyoda, H., Katsuragi, K., Tamai, T. and Ouchi, S. (1991) DNA sequence of genes for detoxification of fusaric acid, a wilt-inducing agent produced by *Fusarium* species. *J. Phytopathol.-Phytopathol. Z.* **133**, 265-277.

Trenholm, H.L., Charmley, L.L., Prelusky, D.B. and Warner, R.M. (1992) Washing procedures using water or sodium-carbonate solutions for the decontamination of 3 cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2147-2151.

Trenholm, H.L., Prelusky, D.B., Young, J.C. and Miller, J.D. (1989) A practical guide to the prevention of *Fusarium* mycotoxins in grain and animal feedstuffs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **18**, 443-451.

Turbic, A., Ahokas, J.T. and Haskard, C.A. (2002) Selective *in vitro* binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Addit. Contam.* **19**, 144-152.

Ueda, S., Oda, M., Imamura, S. and Ohnishi, M. (2004) Transient-phase kinetic studies on the nucleotide binding to 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas* sp B-0831 using fluorescence stopped-flow procedures. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1774-1780.

Ueno, Y. (1984) Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam. Appl. Toxicol.* **4**, 124-132.

Underhill, K.L., Rotter, B.A., Thompson, B.K., Prelusky, D.B. and Trenholm, H.L. (1995) Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **54**, 128-134.

Urlings, H.A.P., Mul, A.J., Vantklooster, A.T., Bijker, P.G.H., Vanlogtestijn, J.G. and Vangils, L.G.M. (1993) Microbial and nutritional aspects of feeding fermented feed (poultry by-products) to pigs. *Vet. Q* **15**, 146-150.

Urrutia Mera, M., Kemper, M., Doyle, R. and Beveridge, T.J. (1992) The membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3837-3844.

Usleber, E., Renz, V., Martlbauer, E. and Terplan, G. (1992) Studies on the application of enzyme immunoassays for the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* **39**, 617-627.

Utsumi, R., Yagi, T., Katayama, S., Katsuragi, K., Tachibana, K., Toyoda, H., Ouchi, S., Obata, K., Shibano, Y. and Noda, M. (1991) Molecular cloning and characterization of the fusaric acid-resistance gene from *Pseudomonas cepacia*. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1913-1918.

Uwajima, T., Takayama, K. and Terada, O. (1978) Production, purification and crystallization of 3a-hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 1577-1583.

Vainio, H., Heseltine, E. and Wilbourn, J. (1993) Report on an IARC working group meeting on some naturally-occurring substances. *Int. J. Cancer* **53**, 535-537.

van Heijenoort, J. (1994) Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit. In *Bacterial Cell Wall* eds. Ghuysen, J.-M. and Hakenbeck, R. Elsevier, Amsterdam.p.39–54.

van Winsen, R.L., Urlings, B.A.P., Lipman, L.J.A., Snijders, J.M.A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H.M. and van Knapen, F. (2001) Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3071-3076.

Vasanthi, S. and Bhat, R.V. (1998) Mycotoxins in foods - Occurrence, health & economic significance & food control measures. *Indian J. Med. Res.* **108**, 212-224.

Viroben, G., Delort-Laval, J., Colin, J. and Adrian, J. (1978) Inactivation of aflatoxin by treatment with ammonia. Study *in vitro* of detoxified groundnut oilcake. *Ann. Nutr. Aliment.* **32**, 167-185.

Vollmer, W. and Tomasz, A. (2002) Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **70**, 7176-7178.

Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. and Merrill, A.H., Jr. (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* **266**, 14486-14490.

Wang, H., Wei, H., Ma, J. and Luo, X. (2000) The fumonisin B1 content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19**, 139-141.

Ward, J.D. and Spears, J.W. (1993) Comparison of copper lysine and copper sulfate as copper sources for ruminants using *in vitro* methods. *J. Dairy Sci.* **76**, 2994-2998.

Wei, C.M., Hansen, B.S., Vaughan, M.H., Jr. and McLaughlin, C.S. (1974) Mechanism of action of the mycotoxin trichodermin, a 12, 13-epoxytrichothecene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 713-717.

Weinberg, G., Z. G., Ashbell, G., Azrieli, A. and Brukental, I. (1993) Ensiling peas, ryegrass and wheat with additives of lactic acid bacteria (LAB) and cell wall degrading enzymes. *Grass and Forage Science* **48**, 70-78.

Weinberg, Z.G. (2003) Effect of lactic acid bacteria on animal performance. *Indian J. Biotechnol.* **2**, 378-381.

Weinberg, Z.G., Chen, Y. and Gamburg, M. (2004a) The passage of lactic acid bacteria from silage into rumen fluid, *in vitro* studies. *J. Dairy Sci.* **87**, 3386-3397.

Weinberg, Z.G. and Muck, R.E. (1996a) New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* **19**, 53-68.

Weinberg, Z.G., Muck, R.E. and Weimer, P.J. (2003) The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 1066-1071.

Weinberg, Z.G., Muck, R.E., Weimer, P.J., Chen, Y. and Gamburg, M. (2004b) Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**, 1-9.

Westlake, K., Mackie, R.I. and Dutton, M.F. (1987) T-2 toxin metabolism by ruminal bacteria and its effect on their growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 587-592.

Whitfield, C. (1988) Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **34**, 415-420.

Whitlow, L.W., Hagler, W.M. and Hopkins, B.A. (1998) Mycotoxin occurrence in farmer submitted samples of North Carolina feedstuffs: 1989-1997. *J. Dairy Sci.* **81 (Abstr.)**, 1189.

Williams, K.C., Blaney, B.J. and Peters, R.T. (1994) Pigs fed *Fusarium* infected maize containing zearalenone and nivalenol with sweeteners and bentonite. *Livest. Prod. Sci.* **39**, 275-281.

Woolford, M.K., Wilkinson, J.M. and Cook, J.E. (1983) Investigations on the effect of sodium bentonite and other moisture absorbents on the production of effluent from grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* **8**, 107-118.

Wu, L., Wang, Q., Wang, S. and Zhou, F. (1992) Biotransformation of zearalenone. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **32**, 11-16.

Xiong, G., Trentmann, G., Thierbach, K., Schulz, B., Kuhns, S. and Maser, E. (2006) Testosterone receptor TeiR effect on testosterone-induced expression of the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase in *Comamonas testosteroni*. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **372**, 134-134.

Xiong, G.M., Martin, H.J., Blum, A., Schafers, C. and Maser, E. (2001) A model on the regulation of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase expression in *Comamonas testosteroni*. *Chem.-Biol. Interact.* **130**, 723-736.

Xiong, G.M., Martin, H.J. and Maser, E. (2003) Identification and characterization of a novel translational repressor of the steroid-inducible 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. *J. Biol. Chem.* **278**, 47400-47407.

Yao, Q., Liu, Z. and Zeng, Y. (1996) Detoxification of deoxynivalenol by scab resistant wheat and the bioactivities of the product. *Acta Mycologica Sinica* **15**, 59-64.

Yiannikouris, A., Andre, G., Buleon, A., Jeminet, G., Canet, I., Francois, J., Bertin, G. and Jouany, J.P. (2004a) Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules* **5**, 2176-2185.

Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. and Jouany, J.P. (2004b) Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* **67**, 1195-1200.

Young, J.C., Subryan, L.M., Potts, D., McLaren, M.E. and Gobran, F.H. (1986) Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 465-467.

Young, J.C., Trenholm, H.L., Friend, D.W. and Prelusky, D.B. (1987) Detoxification of deoxynivalenol with sodium bisulfite and evaluation of the effects when pure mycotoxin or contaminated corn was treated and given to pigs. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 259-261.

Young, J.C., Zhu, H.H. and Zhou, T. (2006) Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 417-424.

Zhang, H. and Li, J. (1994) Detoxification of moniliformin. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **34**, 119-123.

Zhang, H. and Li, J. (1997) Detoxifying moniliformin in grains and water. *J. Environ. Sci.* **9**, 215-220.

Zhang, X.B. and Ohta, Y. (1991) Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria on mutagens. *J. Dairy Sci.* **74**, 1477-1481.

ANNEXES

Centre de Recherche de Clermont-Theix **Groupe des MYCOTOXINES** **URH-DIMA** **63122 Saint-Genès-Champanelle.**	**MODE OPERATOIRE NORMALISE**
	Réf :
	Rédigée le 12/04/2004
	Validée le 25/04/2004
OBJET : Culture des principaux genres de bactéries fermentaires	
Auteurs du document : Hamid BOUDRA, Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☑ Technicien(s) ☑ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

I- OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire les milieux de culture et les conditions d'incubation pour la culture des principaux genres de bactéries fermentaires incluant les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus*, et les bactéries propioniques appartenant au genre *Propionibacterium*.

II- MATERIELS ET METHODES

1. Milieux et réactifs

- Milieu de De Man, Rogosa, Sharpe (bouillon MRS) — Réf : OXOÏD CM0359
- Milieu M17 (bouillon) — Réf : OXOÏD CM0817
- Extrait de levure — Réf : OXOÏD LP0021
- Lactate de sodium en sirop 60% (w/w) — Réf : Sigma L1375
- Peptone bactériologique — Réf : OXOÏD LP0037
- Tryptone — Réf : OXOÏD LP0042
- Lactose — Réf : OXOÏD LP0070
- Tampon étalonnage pH metre pH 7,01 — Réf : HANNA HI 8007
  pH 4,01 — Réf : HANNA HI 8004
- HCl — Réf : Normapur 20.252.290
- NaOH — Réf : Rectapur 28.245.298
- Agar — Réf : OXOÏD LP0011

2. Appareillage

- Hotte microbiologique (ou bec bunsen) — Réf : HERA CELL (Labo mycologie)
- Autoclave — Réf : Laboster (Subtil Crépieux)
- Etuve 30°C — Réf : Bioconcept Firlabo
- Etuve 37°C — Réf : HERA CELL
- Balance — Réf : METTLER AE 200
- pH-mètre — Réf : SHOTT GERATE CG820
- Ballons 1 et 2 litres — Réf : DUTSCHER
- Tubes en verre 16x160 — Réf : DUTSCHER
- Erlens 250 ml — Réf : VWR 21 216 36 05
- Coton cardé — Réf : DUTSCHER 30231
- Agitateur magnétique chauffant — Réf : IKAMAG RET (MOTOR)
- Pipettes stériles — Réf : DUTSCHER 004012
- Anses à inoculer — Réf : DUTSCHER 731175GO

3. Méthodes

3.1 Préparation des milieux de culture

3.1.1 Culture des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus*
Le milieu **MRS** est préparé directement à partir du produit déshydraté (Oxoïd).

- Verser **52 g** de poudre dans 1 litre d'eau distillée dans un ballon à fond plat
- Mélanger et chauffer jusqu'à dissolution complète sur agitateur magnétique
- Répartir et stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave
- Après autoclavage, contrôler le pH à 25°C. Si nécessaire, ajuster à pH 6,2 ± 0,2 avec HCl ou NaOH stérile

COMPOSITION DU MILIEU MRS	**(grammes/litre)**
Peptone	10,0
Extrait de viande de boeuf	8,0
Extrait de levure	4,0
Glucose	20,0
Tween 80	1,0 ml
Hydrogénophosphate de potassium	2,0
Acétate de sodium 3 H_2O	5,0
Citrate d'ammonium	2,0
Sulfate de magnésium 7 H_2O	0,2
Sulfate de manganèse 4 H_2O	0,05

3.1.2 Culture des genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*
Le milieu est préparé à partir du produit déshydraté **M17** (Oxoïd) auquel est ajouté une solution de lactose.

- Verser **37,25 g** de poudre dans 950 ml d'eau distillée dans un ballon à fond plat
- Mélanger et chauffer jusqu'à dissolution complète sur agitateur magnétique
- Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave
- Après autoclavage, contrôler le pH à 25°C. Si nécessaire, ajuster à pH 6,9 ± 0,2 avec HCl ou NaOH stérile
- Refroidir à **50°C** et ajouter stérilement **50 ml** d'une solution stérile de lactose à 10 % (w/v)

COMPOSITION DU MILIEU M17	**(grammes/litre)**
Tryptone	5,0
Peptone de soja	5,0
Infusion de viande	5,0
Extrait de levure	2,5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,25
Glycérophosphate disodique	19,0

Solution de lactose à 10 % (w/v)

Dissoudre **10 g** de lactose dans **100 ml** d'eau distillée. Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave ou par filtration sur membrane de 0,2 µm.

3.1.3 Culture du genre *Propionibacterium*
Le milieu **Yeast Extract Lactose (YEL)** est préparé selon la formule suivante :

Peptone	5g
Tryptone	5g
Extrait de levure	5g
Sirop Lactate de sodium 60% (w/w)	16,7g
Eau distillée	qsp 1l

- Verser les ingrédients dans 1 litre d'eau distillée dans un ballon à fond plat
- Mélanger et chauffer jusqu'à dissolution complète sur agitateur magnétique
- Stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave
- Après autoclavage, contrôler le pH à 25°C. Si nécessaire, ajuster à pH 6,8 ± 0,2 avec HCl ou NaOH stérile

3.1.4 Cultures sur milieu gélosé
Les cultures peuvent être effectuées sur milieu gélosé en ajoutant **10 g/l** d'agar au moment de la préparation des milieux.

3.2 Ensemencement
Le milieu adéquat est ensemencé à partir d'une pré-culture (cas d'une revivification d'une souche cryogénisée) ou directement à partir d'une culture sur gélose.

La majorité des bactéries fermentaires étant aéro-anaérobies, éviter d'ensemencer des milieux présentant une trop grande surface d'échange air-milieu (utiliser des tubes en verre 16x160 ou des erlens suffisamment remplis) et d'agiter le milieu avant la période d'incubation.

Dans le cas particulier des *Propionibacteria*, qui sont moins tolérants à l'oxygène, le milieu YEL doit être régénéré juste avant emploi : Porter le milieu à ébullition pendant 10 mn afin d'éliminer l'oxygène dissout et refroidir immédiatement à la température d'incubation.

3.3 Conditions d'incubation
Les cultures sont incubées **sans agitation** à **30°C** (souches mésophiles) ou 37°C (souches thermophiles) selon leur température optimale de croissance durant **24h**, sauf de le cas des *Propionibacteria* pour lesquels la période d'incubation est de **72h**.

Centre de Recherche de Clermont-Theix **Groupe des MYCOTOXINES** **URH-DIMA** **63122 Saint-Genès-Champanelle.**	**MODE OPERATOIRE NORMALISE**
	Réf :
	Rédigée le 13/05/2004
	Validée le 18/05/2004
OBJET : Conservation des souches de bactéries fermentaires par cryogénisation	
Auteurs du document : Hamid BOUDRA, Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☑ Technicien(s) ☑ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

I- OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode de conservation longue des souches de bactéries fermentaires (bactéries lactiques et propioniques) par cryogénisation. Cette méthode permet de stopper le développement des bactéries tout en permettant leur revivification après une longue période de conservation.

II- MATERIELS ET METHODES

1. Milieux et réactifs

- Milieux de culture des bactéries fermentaires — Réf : Cf. MO *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires*
- Glycérol — Réf : RECTAPUR 24 387.292

2. Appareillage

- Hotte microbiologique ou bec bunsen — Réf : HERA CELL (Labo mycologie)
- Congélateur -80°C — Réf : Equipe DIMA
- Autoclave — Réf : Laboster (Subtil Crépieux)
- Cryotubes 2 ml — Réf : MILIAN NA-5000-0020
- Pipettes stériles — Réf : DUTSCHER 004012
- Anses à inoculer — Réf : DUTSCHER 731175GO
- Tubes polypropylène diam. 0,5cm — Réf : Labo des fermentations

3. Méthodes

- Les souches de bactéries fermentaires à conserver sont cultivées en milieu de culture conformément au MO *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires*
- Pour chaque souche, 1 ml de culture fraîche est transféré stérilement dans un ou plusieurs cryotubes neufs
- 0,3 ml de glycérol préalablement autoclavé à 121°C pendant 15 mn sont ajoutés stérilement dans le cryotube
- Les cryotubes sont homogénéisés par retournements successifs et placés dans un congélateur à -80°C
- Revivification : 1 öse de culture cryogénisée est transférée dans un tube en polypropylène diamètre 0,5 ml stérile contenant 2 ml de milieu de culture (culture : cf. MO *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires*).
  IMPORTANT : Le cryotube doit être replacé immédiatement à -80°C et ne doit jamais être décongelé lors de l'étape de revivification

Centre de Recherche de Clermont-Theix **Groupe des MYCOTOXINES** **URH-DIMA** **63122 Saint-Genès-Champanelle.**	**MODE OPERATOIRE NORMALISE**
	Réf :
	Rédigée le 27/06/2004
	Validée le 12/07/2004
OBJET : Méthode turbidimétrique pour l'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires en milieu de culture	
Auteurs du document : Hamid BOUDRA, Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☑ Technicien(s) ☑ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

I- OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode rapide d'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires en milieu de culture, incluant les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Pediococcus*, et les bactéries propioniques appartenant au genre *Propionibacterium*.

II- MATERIELS ET METHODES

Dans une certaine zone de concentration, il y a proportionnalité entre l'absorbance à 600 nm et la concentration de cellules dans un milieu liquide

Concentration bactérienne (en UFC/ml) = 1/k x DO_{600}

UFC : Unités formant colonies
DO_{600} : Absorbance à 600 nm
k (UFC. ml^{-1}. UDO^{-1}): coefficient, préalablement déterminé pour chaque genre par corrélation de la DO_{600} avec des numérations effectuées sur milieu gélosé (méthode de référence)

1. Milieux et réactifs

- Milieux de culture des bactéries fermentaires — Réf : Cf. MO *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires*

2. Appareillage

- Spectrophotomètre — Réf : HITACHI U-2000
- Cuvettes pour spectrophotométrie — Réf : DUTSCHER 391094
- Pipettes 1ml — Réf : DUTSCHER 004012
- Pipettes 10 ml — Réf : DUTSCHER 004492

3. Méthodes

- Homogénéiser la culture bactérienne dont la concentration cellulaire est à estimer
- Mesurer la DO_{600} de cette suspension contre le milieu stérile non ensemencé (blanc) = DO_{600} relative
- Diluer la culture dans du milieu stérile non ensemencé si la valeur de DO_{600} relative ne se trouve pas dans la zone de linéarité (Cf. VII)

♦ Expression des résultats

Concentration bactérienne (en UFC/ml) = 1/k x DO relative x facteur de dilution

GENRE	**MILIEU**	**COEFFICIENT k** (UFC. ml^{-1}. UDO^{-1})	**Zone de linéarité** **DO_{600} relative**
Lactobacillus	MRS	$8,7 \times 10^{-9}$	0,06 – 1,38
Lactococcus	M17 Lactose	$1,7 \times 10^{-9}$	0,07 – 1,25
Propionibacterium	YEL	$2,8 \times 10^{-10}$	0,07 – 1,16
Leuconostoc	MRS	$4,4 \times 10^{-9}$	0,07 – 1,39
Pediococcus	MRS	$6,7 \times 10^{-9}$	0,14 – 1,25
Streptococcus	M17 Lactose	$1,7 \times 10^{-8}$	0,05 – 0,84
Enterococcus	M17 Lactose	$1,7 \times 10^{-8}$	0,05 – 0,84

Rq : Les valeurs de k pouvant varier selon les spectrophotomètres, les mesures turbidimétriques doivent toujours être réalisées sur le même appareil.

Centre de Recherche de Clermont-Theix **Groupe des MYCOTOXINES** **URH-DIMA** **63122 Saint-Genès-Champanelle.**	**MODE OPERATOIRE NORMALISE**
	Réf :
	Rédigée le 11/01/2005
	Validée le 19/01/2005
OBJET : Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié	
Auteurs du document : Hamid BOUDRA, Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☑ Technicien(s) ☑ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

I- OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire le dosage des fusariotoxines déoxynivalénol (DON), zéaralénone (ZEN) et fumonisines B_1 et B_2 (FB_1 et FB_2) dans l'infusât de maïs acidifié au pH de l'ensilage (pH 4). Elle peut, par exemple, s'appliquer pour cribler des bactéries fermentaires (bactéries lactiques et propioniques) pour leur capacité à séquestrer et/ou biotransformer les fusariotoxines dans des conditions simulant les ensilages de maïs.

II- MATERIELS ET METHODES

1. Milieux et réactifs

- Maïs ensilage MS = 35 % — Réf : Annexe élevage
- Acide lactique 90% — Réf : RECTAPUR 20 356.298
- Acide acétique 100% (CH_3COOH) — Réf : RP Normapur 20 104.298
- Tampon étalonnage pH metre pH 7,01 — Réf : HANNA HI 8007
  pH 4,01 — Réf : HANNA HI 8004
- Zéaralénone — Réf : SIGMA Z-2125
- Fumonisine B_1 — Réf : SIGMA F-1147
- Fumonisine B_2 — Réf : SIGMA F-3771
- Méthanol — Réf : PROLABO Chromanorm UN 1230
- Acétonitrile — Réf : PROLABO Chromanorm UN 1648
- Di-sodium tétraborate ($Na_2B_4O_7$, 10 H_2O) — Réf : RP Normapur 27 727.297
- o-phtaldialdéhyde (OPA) — Réf : SIGMA P-1378
- 2-mercapto-Ethanol — Réf : SIGMA M-6250

2. Appareillage

- Balance — Réf : METTLER AE 200
- Etuve 60°C — Réf: JOUAN (Labo fermentations)
- pH-mètre — Réf : CG820 (SHOTT GERATE)
- Becher 1L — Réf : Labo des fermentations
- Agitateur magnétique chauffant — Réf : IKAMAG RET (MOTOR)
- Barquette aluminium — Réf : Labo des fermentations
- Filtres papier — Réf : Durieux n°120
- Fiole jaugée 1L — Réf : Labo des fermentations
- Plaque chauffante — Réf : Labotech EM 3300T
- Pots à centrifuger 250 ml — Réf : Labo des fermentations
- Tamis — Réf : Retsch 200mm x 50 mm ; 400µm

♦ Seringue 20 ml	Réf : DUTSCHER 050010
♦ Filtres seringue 0,45 µ	Réf : DUTSCHER 146561
♦ Vortex	Réf : Yellow line TTS2
♦ Pipettes automatiques calibrées	Réf : 2-20µl Ep Research 4594443 Réf : 20-200µl Ep Research 4534623 Réf : 100-1000µl Ep Research 4480773
♦ Pointes pipettes	Réf : EPPENDORF
♦ Centrifugeuse + Rotor GSA	Réf : SORVALL RC-5B
♦ Tubes Falcon 50 ml	Réf : Labo des fermentations
♦ Chaîne HPLC + logiciel acquisition Karat	Réf : Beckman
♦ Colonnes HPLC n°4	Réf: Bishoff – Prontosil, 125x4.6, 3
n°7	Réf : Macherey-Nagel CC/125/4.6 Nucleodur C18 Pyramid, 5µm
n°10	Réf : Macherey-Nagel CC/125/4.6 Nucleodur C18 Pyramid, 5µm
♦ Appareil à Eau Milli-Q	Réf : Elgastat UHQ
♦ Fiole à vide + porte filtre	Réf : Laboratoire mycotoxines
♦ Filtres 0,45 µm	Réf : MILLIPORE cat HNWP04700
♦ Vials coniques + septa + bouchons verts (ZEN)	Réf : Labo mycotoxines
♦ Vials prép + septa + bouchons noirs (FB)	Réf : Labo mycotoxines

3. Méthodes

3.1 Préparation de l'infusât de maïs acidifié

Pour 1litre :

- Sécher le maïs ensilage à l'étuve à **60°C** pendant **12h minimum** dans une barquette en aluminium propre (l'épaisseur de la couche de maïs ne doit pas dépasser 2 cm)
- Immerger **60g** de maïs sec dans 1litre d'eau distillée dans un bécher de 1l
- Laisser macérer pendant **2h à 60°C** (sur plaque chauffante Labotech: réglage 120°C). Contrôler régulièrement la température
- Filtrer grossièrement sur tamis
- Compléter le volume à 1 litre dans une fiole jaugée
- Filtrer sur papier filtre Durieux n°120
- Centrifuger **5 mn à 8500 rpm** dans des pots à centrifuger
- Récupérer le surnageant
- Ajuster le pH à **4** avec de l'acide lactique 90% (pH initial = 5,5)
- Stériliser par filtration (seringue + filtre 0,45 µ) et conditionner en tubes falcon de 50 ml

Conserver à 4°C. Par sécurité, filtrer à nouveau (0,45 µm) avant utilisation.

3.2 Contamination de l'infusât de maïs acidifié

La contamination de l'infusât de maïs acidifié est réalisée à partir de solutions de DON (solvant : eau UHQ), de ZEN (solvant : Eau UHQ-ethanol 1 :4) ou de fumonisines (solvant : eau UHQ).

3.3 Analyses

Les fusariotoxines DON, ZEN, FB_1 et FB_2 sont toutes dosées par CLHP sans extraction préalable. La détection du DON est réalisée à l'aide d'un détecteur à barrette de diode, tandis qu'un détecteur de fluorescence est utilisé pour le dosage de la ZEN et des fumonisines. Les fumonisines n'étant pas fluorescentes, une étape de dérivatisation préalable est nécessaire.

3.3.1 Dosage de la ZEN

L'infusât contaminé est injecté directement.

3.3.2 Dosage des fumonisines FB_1 et FB_2

Préparation du réactif de dérivatisation

- Préparation du **tampon borate 0,1 M, pH 10** : Dissoudre **3,8 g** de $Na_2B_4O_7$, 10 H_2O dans **100 ml** d'eau UHQ

- Dans un flacon ambré, dissoudre **80 mg** d'OPA dans **2 ml** de méthanol, puis diluer dans **10 ml** de tampon borate pH 10
- Ajouter **100 µl** de 2-mercaptoéthanol (sous hotte et avec protection)

Cette solution doit être préparée au moins 24h avant utilisation et n'est stable qu'une semaine à température ambiante et à l'obscurité.

Dosage
- **10 µl** d'infusât contaminé sont ajoutés à **90 µl** de tampon borate pH 10 (dilution au 1/10ème)
- **100 µl** de réactif de dérivatisation sont ajoutés (t = 0). A t = 20 secondes, le vial est mélangé au vortex pendant 10 secondes. L'analyse est lancée à **t = 2 mn** (Start)

3.3.3 Dosage du DON
L'infusât contaminé est injecté directement.

3.3.4 Conditions chromatographiques

Toxine	**Colonne**	**Phase mobile**	**Débit ml/min**	**λ nm**	**Vol. Inj. (µl)**	**Tps analyse**
ZEN	**7** (Macherey-Nagel CC/125/4.6 nucleodur C18 Pyramid, 5µm)	Eau-MeOH (40:60)	1,20	λ exc: 274 λ em: 440	50	15 mn (Tr=**10,4 mn**)
FB	**4** (Prontosil, 125x4.6, 3) Bishoff	**A:** Eau-MeOH (50:50) pH 3.35 avec CH_3COOH **B:** Acétonitrile	1	λ exc: 336 λ em: 440	20	15 mn Tr FB1=**9,8 mn** Tr FB2=**12,5 mn**
DON	**10** (Macherey-Nagel CC/125/4.6 nucleodur C18, 5 µm)	Eau-ACN (95:5)	1	220 nm	20	34 mn (Tr=**12,7 mn**)

- Les dosages de la ZEN et du DON sont réalisés en isocratique
- Dans le cas du DON, après 14 mn de run, la colonne est lavée avec une solution ED-ACN (80 :20) pour éliminer les interférences, puis réquilibrée pendant 6 mn avec la phase mobile avant l'injection suivante
- Dans le cas des fumonisines, le gradient suivant est appliqué :

.

10% à 60% (B) en 6 mn
60% (B) pendant 7 mn
60% à 10% (B) en 1 mn
10% (B) pendant 1 mn

3.3.5 Expression des résultats
La concentration en fusariotoxine est calculée par rapport à une gamme de calibration.

Centre de Recherche de Clermont-Theix **Groupe des MYCOTOXINES** **URH-DIMA** **63122 Saint-Genès-Champanelle.**	**MODE OPERATOIRE NORMALISE**
	Réf :
	Rédigée le 11/09/2005
	Validée le 21/09/2005
OBJET : Dosage de la zéaralénone, de l'α zéaralénol et du β zéaralénol dans les fractions solides et liquides du jus de rumen	
Auteurs du document : Hamid BOUDRA, Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☑ Technicien(s) ☑ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

I- OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire le dosage de la zéaralénone (ZEN) et de 2 dérivés, l'α zéaralénol (α ZOL) et le β zéaralénol (β ZOL) dans les fractions solides et liquides du jus de rumen. Elle peut s'appliquer pour étudier les interactions entre les microorganismes de l'écosystème ruminal et la ZEN, comme la capacité de ces microorganismes à séquestrer et biotransformer cette fusariotoxine.

II- MATERIELS ET METHODES

1. Milieux et réactifs

- Jus de rumen de 3 moutons mis à jeun de nourriture et d'eau pendant 24h — Réf : Annexe élevage INRA
- Zéaralénone — Réf : Sigma Z2125
- α-zéaralénol — Réf : Sigma Z0166
- β- zéaralénol — Réf : Sigma Z2000
- Acide acétique 100% (CH_3COOH) — Réf : RP Normapur 20 104.298
- Méthanol — Réf : PROLABO Chromanorm UN 1230
- Acétonitrile — Réf : PROLABO Chromanorm UN 1648
- Tampon d'incubation du jus de rumen. — Préparation : selon Goering & Vansoest
Composition : Cf. méthode n°397 (AQ URH)

2. Appareillage

- Vortex — Réf : Yellow line TTS2
- Pipettes automatiques calibrées — Réf : 2-20µl Ep Research 4594443
Réf : 20-200µl Ep Research 4534623
Réf : 100-1000µl Ep Research 4480773
- Pointes pipettes — Réf : EPPENDORF
- Centrifugeuse + Rotor GSA — Réf : SORVALL RC-5B
- Chaîne HPLC + logiciel acquisition Karat — Réf : Beckman
- Colonne **n°3** — Réf : Bischoff, 125 x 4,6 mm ; Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm
- Appareil à Eau Milli-Q — Réf : Elgastat UHQ
- Fiole à vide + porte filtre — Réf : Laboratoire mycotoxines
- Filtres 0,45 µm — Réf : MILLIPORE cat HNWP04700
- Vials coniques + septa + bouchons verts — Réf : Labo mycotoxines
- Gaze — Réf : Labo des fermentations

- Tubes de Hungate — Réf : Labo des fermentations
- Tube à hémolyse — Réf : Labo mycotoxines
- Bloc chauffant (+ azote) — Réf : Labo mycotoxines
- Bain à ultra-sons — Réf : Deltasonic
- Microtubes 1,5 ml — Réf : Labo des fermentations
- Agitateur — Réf : Heidolph Reax2

3. Méthodes

3.1 Traitement du jus de rumen

Selon la nature de l'expérimentation, le jus de rumen (JR) à analyser peut avoir été soumis à un cycle de fermentation *ex vivo*. Dans ce cas, le JR a été filtré sur gaze, dilué au 1/3 dans le tampon d'incubation de Goering & Vansoest, additionné d'un substrat végétal et incubé en anaérobiose dans des tubes de Hungate. Le présent dosage a été réalisé dans ces conditions.
Avant analyse, les fraction solides et liquides sont séparées par centrifugation à **3000g** pendant **10 min**

3.2 Analyses

Après centrifugation du jus de rumen, la ZEN est dosée par CLHP dans le surnageant (fraction liquide) et, après extraction, dans le culot (fraction solide). La détection est réalisée par un détecteur de fluorescence et un détecteur à barrette de diode placés en série.

3.2.1 Dosage de la ZEN et des zéaralénols dans la fraction liquide
Après centrifugation, **20 µl** du surnageant sont directement injectés dans la chaîne CLHP.

3.2.2 Dosage de la ZEN et des zéaralénols dans la fraction liquide

- **5 ml** de **méthanol** sont ajoutés à la totalité du culot
- L'ensemble est agité pendant **15 mn** (réglage agitateur sur **4**) puis centrifugé à **4500 rpm** pendant **10 mn**
- **1 ml** de surnageant est transféré dans un tube à hémolyse neuf et évaporé à sec sous azote à **45 °C**
- L'extrait sec est repris dans **250 µl de PM filtrée**, agité au vortex **10 sec**, passé **3 mn dans un bain à ultra-sons**, puis agité de nouveau au vortex **10 sec**
- L'extrait est transféré dans un microtube et centrifugé à **7000 rpm** pendant **3 mn**
- **20 µl** sont injectés dans la chaine CLHP

Dans ces conditions, le rendement d'extraction est de **96%**.

3.2.3 Conditions chromatographiques
La détection est réalisée en isocratique par un détecteur de fluorescence et un détecteur à barrette de diode placés en série.

Colonne	**Phase mobile**	**Débit ml/min**	**λ nm**	**Vol. Inj. (µl)**	**Tps analyse**
3 (Bischoff, 125 x 4,6 mm ; Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm)	MeOH / Ac acétique 1% / ACN (45 : 45 : 10)	1	λ exc: 274 λ em: 440 Détection UV = 274 nm	20	27 mn Tr β ZOL=**12,1 mn** Tr α ZOL=**19,9 mn** Tr ZEN=**24,2 mn**

3.2.4 Expression des résultats
Les concentrations en ZEN, α ZOL et β ZOL sont calculées par rapport à des gammes de calibration.

Centre de Recherche de Clermont-Theix **Groupe des MYCOTOXINES** **URH-DIMA** **63122 Saint-Genès-Champanelle.**	**MODE OPERATOIRE NORMALISE**
	Réf :
	Rédigée le 2/05/2005
	Validée le 24/05/2005
OBJET : Dosage de la zéaralénone et de l'α zéaralénol dans le culot bactérien	
Auteurs du document : Hamid BOUDRA, Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☑ Technicien(s) ☑ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

I- OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire le dosage de la zéaralénone (ZEN) et de l'α zéaralénol (α ZOL) dans des culots bactériens. Elle peut, par exemple, s'appliquer pour déterminer les fractions de ZEN et d' α ZOL séquestrées par les bactéries dans certaines conditions.

II- MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

Le matériel utilisé pour ce mode opératoire est inclus dans le MO *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié* (annexe 4).

2. Extraction

- Ajouter **500 µl** de méthanol au culot bactérien
- Agiter au vortex **1 mn** (vitesse maximale) et laisser reposer **10 mn** à la température du laboratoire
- Agiter à nouveau au vortex **1 mn** (vitesse maximale)
- Centrifuger à **4500 rpm** pendant **10 mn** (4°C)
- Evaporer à sec **200 µl** de surnageant à 45°C sous flux d'azote
- Reprendre dans **200 µl** de mélange Méthanol – ED 60 :40 et injecter 20 µl dans le systèmes CLHP

3. Séparation chromatographique et détection

- Colonne n°3 (Bischoff, 125 x 4,6 mm ; Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm)
- Phase mobile (PM) = Méthanol / Acide acétique 1% dans ED (65/35)
- Débit phase mobile : 0,8 ml/min
- *Détection en fluorescence*:
  λ_{Exc} = 274 nm
  λ_{Em} = 440 nm
  PMT = 600 V

4. Expression des résultats

Les concentration en ZEN et α ZOL sont calculées par rapport à des gammes de calibration.

Laboratoire des MYCOTOXINES **URH-DIMA**	**PROTOCOLE**
	Réf : PROT-URH-DIMA/Elim. fusariotoxines
	Rédigé le 27/01/2005
	Validé le 12/02/2005
OBJET : Elimination des fusariotoxines par les bactéries fermentaires. Essais préliminaires pour la mise au point d'un test *in vitro* en vue d'un criblage de souches.	
Auteur du document : Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☐ Technicien(s) ☐ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

SOMMAIRE

I- OBJECTIF **2**

II- MATERIELS ET REACTIFS **2**
1. Matériels 2
2. Milieux et réactifs 3
3. Préparation des solutions tampons 3
4. Solutions stock de fusariotoxines 3
5. Souches bactériennes 4

III- PROTOCOLE **5**
1. Cultures bactériennes, estimation de la concentration cellulaire et récupération des bactéries 5
2. Elimination du déoxynivalénol et des fumonisines B_1 et B_2 en milieu de culture 6
3. Effet du pH et de la viabilité des bactéries sur le niveau d'élimination des fusariotoxines 6
4. Effet de la concentration bactérienne sur l'élimination du déoxynivalénol, de la zéaralénone et des fumonisines B_1 et B_2 en infusât de maïs acidifié par 3 souches de bactéries lactiques 11
5. Effet du stade de croissance de *Lactobacillus rhamnosus* GG sur l'élimination de la zéaralénone et des fumonisines B_1 et B_2 14
6. Dosage des fusariotoxines 14
7. Expression des résultats 14

I- OBJECTIF

L'objectif de ce travail est de i) évaluer d'une manière globale la capacité des bactéries fermentaires à éliminer les fusariotoxines majeures par biodégradation et/ou séquestration avec 30 souches appartenant à différents genres, ii) étudier l'influence du pH, de la viabilité des bactéries, de la concentration bactérienne et du stade de croissance sur cette élimination afin de fixer les paramètres d'un test *in vitro* en vue du criblage d'un nombre plus important de souches.

II- MATERIELS ET REACTIFS

1. Materiels

- Matériels des modes opératoires (MO) suivants :
  - *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 1)
  - *Conservation des souches de bactéries fermentaires par cryogénisation* (annexe 2)
  - *Méthode turbidimétrique pour l'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 3)
  - *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié* (annexe 4)

♦ Autoclave	Réf : Laboster (Subtil Crépieux)
♦ Balance	Réf : METTLER AE 200
♦ Balance de précision	Réf : PRECISA 40SM-200A
♦ PH-mètre	Réf : CG820 (SHOTT GERATE)
♦ Tampon étalonnage pH mètre pH 7,01	Réf : HANNA HI 8007
pH 4,01	Réf : HANNA HI 8004
♦ Ballons 1 et 2 litres	Réf : DUTSCHER
♦ Tubes 18x180	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Tubes 16x160	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Appareil à Eau Milli-Q	Réf : Elgastat UHQ
♦ Flacons autoclavables 250 ml / 500ml	Réf : DUTSCHER 001093 / 007094
♦ Erlens 250 ml	Réf : DUTSCHER 211907
♦ Becher 1L (bain-marie)	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Agitateur magnétique chauffant	Réf : IKAMAG RET (MOTOR)
♦ Etuve 30°C/37°C	Réf : HERA CELL (Labo mycologie)
♦ Etuve équipée d'une prise électrique	Réf : MEMMERT
♦ Tubes polypropylène diam.0,5 et 1cm	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Coton cardé	Réf : Laboratoire mycologie
♦ Tubes cap. Rouge	Réf : Laboratoire mycotoxines
♦ Vortex	Réf : Yellow line TTS2
♦ Pipettes automatiques calibrées	Réf : 2-20µl Ep Research 4594443
	Réf : 20-200µl Ep Research 4534623
	Réf : 100-1000µl Ep Research 4480773
♦ Pointes pipettes	Réf : EPPENDORF
♦ Agitateur (tubes)	Réf : IKA KS 130 Basic
♦ Centrifugeuse + Rotor GSA	Réf : SORVALL RC-5B
♦ Pots à centrifuger 250 ml	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Adaptateurs 7 tubes diam 1 cm (rotor GSA)	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Système d'aspiration sous vide	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Spectrophotomètre	Réf : HITACHI U2000
♦ Cuves en quartz 10mm (scan mycotoxines)	Réf : HELLMA type 104.002-QS
♦ Tubes à hémolyse	Réf : TH12756RO500
♦ Microtubes 1,5 ml	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Tubes Falcon 15 ml et 50 ml	Réf : Laboratoire des fermentations
♦ Chaîne HPLC + logiciel acquisition	Réf : Thermo Finnigan 143386
♦ Colonnes HPLC n°4	Réf: Bishoff – Prontosil, 125x4.6, 3µm
n°7	Réf : Macherey-Nagel CC/125/4.6 Nucleodur C18 Pyramid, 5µm
n°8	Réf: Macherey-Nagel CC 125/3 nucleodur C18, 5µm

- Appareil à Eau Milli-Q — Réf : Elgastat UHQ
- Fiole à vide + porte filtre — Réf : Laboratoire mycotoxines
- Filtres 0,45 µm — Réf : MILLIPORE cat HNWP04700
- Vials coniques 250 µl+ cap. verts — Réf : Laboratoire mycotoxines
- Vials fond plat 500 µl (prep) coniques + cap. noirs — Réf : Laboratoire mycotoxines

2. Milieux et réactifs

- Milieux de culture des bactéries fermentaires (Cf. MO *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires*)
- Infusât de maïs acidifié (Cf. MO *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié*)
- Tampon PBS 0,01M pH 7,4 — Réf : Sigma, 1000-3
- Acide citrique $C_6H_8O_7$, 1 H_20 — Réf : RP Normapur 28 278.232
- Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) — Réf : RP Normapur 28 027.262
- Sodium di-hydrogénophosphate (NaH_2PO_4) — Réf : RP Normapur 28 013.264
- Acide phosphorique (H_3PO_4) — Réf : SIGMA P-6560
- Déoxynivalénol — Réf : SIGMA D-0156
- Nivalénol — Réf : SIGMA N-7769
- Zéaralénone — Réf : SIGMA Z-2125
- Fumonisine B_1 — Réf : SIGMA F-1147
- Fumonisine B_2 — Réf : SIGMA F-3771
- Ethanol absolu — Réf : Carlo Erba Reagenti 414607
- Méthanol — Réf : PROLABO Chromanorm UN 1230
- Acide lactique 90% — Réf : RECTAPUR 20 356.298
- Acétonitrile — Réf : PROLABO Chromanorm UN 1648
- Réactif de dérivatisation (dosage FB_1/FB_2)
  - Tampon borate pH 10 ($Na_2B_4O_7$, 10 H_2O 0,1M) — Réf : Agilent Technologies
  - o-phtaldialdéhyde (OPA) — Réf : SIGMA P-1378
  - 2-Mercapto-Ethanol — Réf : SIGMA M-6250

3. Préparation des solutions tampons

100 ml de solutions tampon à **pH 4 ; 6 ; 7,4 et 7,8**, sont préparés à partir de quantités variables des 2 solutions-mères suivantes :

Solution A : composition pour 1l

Acide citrique ($C_6H_8O_7$, 1 H_20) (g)	21,01
Eau distillée	qsp 1l

Solution B : composition pour 1l

Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) (g)	28,4
Eau distillée	qsp 1l

- Tampon **pH 4,0**
  62,0 ml solution A + 38,0 ml solution B
- Tampon **pH 6,0**
  37,4 ml solution A + 62,6 ml solution B
- Tampon **pH 7,4**
  9,8 ml solution A + 90,2 ml solution B
- Tampon **pH 7,8**
  4,6 ml solution A + 95,4 ml solution B

Les solutions tampon sont autoclavées (121°C, 15 min).
Le pH est vérifié avant et après autoclavage.

4. Solutions stock de fusariotoxines

4.1. Déoxynivalénol (DON)

Reconstitution solution stock de DON (27/09/2004, lot 034K4023) dans l'acétonitrile (ACN) = **SS1/DON** (**#1 mg/ml**)

Dosage spectrophotométrique :
50 µl SS1/DON + 450 µl ACN
Puis, 200 µl de cette solution + 400 µl ACN
DO_{218nm} = 0,710

[**SS1/DON**] = 0,710 × 46,25 × 3 × 10 = **985 µg/ml**

*Préparation solution stock à **100 µg/ml** (SS2/DON)*
508 µl SS1/DON + 4492 µl ACN

4.2. Fumonisines B_1 et B_2 (FB_1 et FB_2)
Reconstitution solutions stocks FB_1 (12/10/2004, lot 033K4007) et FB_2 (17/11/2004, lot 073K1507) avec un volume précis de mélange ACN/eau (1/1) (pas de scan possible)

[SS1/FB_1] = 2000 µg/ml : 10 mg FB_1 + 5 ml ACN/eau (1/1) par pesée
[SS1/FB_2] = 3333 µg/ml : 10 mg FB_2 + 3 ml ACN/eau (1/1) par pesée

*Préparation solution stock à **100 µg/ml** (SS2/FB_1 et SS2/FB_2)*
SS2/FB_1: 200 µl SS1/FB_1 + 3800 µl ACN/eau (1/1)
SS2/FB_2: 120 µl SS1/FB_2 + 3880 µl ACN/eau (1/1)

4.3 Nivalénol (NIV)
Reconstitution solution stock de NIV (27/09/2004, lot 073K4054) dans le méthanol (MeOH) = **SS1/NIV** (**#1 mg/ml**)

Dosage spectrophotométrique :
50 µl SS1/NIV + 450 µl MeOH
Puis, 200 µl de cette solution + 400 µl MeOH
DO_{218nm} = 0,627

[**SS1/NIV**] = 0,627 × 49,52 × 3 × 10 = **931 µg/ml**

*Préparation solution stock à **100 µg/ml** (SS2/NIV)*
537 µl SS1/NIV + 4463 µl MeOH

4.4 Zéaralénone (ZEN)
Reconstitution solution stock de ZEN (02/09/2004, lot 122K4068) dans le MeOH = **SS1/ZEN**

Dosage spectrophotométrique :
50 µl SS1/ZEN + 450 µl MeOH
Puis, 20 µl de cette solution + 480 µl MeOH
DO_{274} = 0,741

[**SS1/ZEN**] = 0,741 × 22,89 × 25 × 10= **4240 µg/ml**

*Préparation solution stock à **100 µg/ml** (SS2/ZEN)*
118 µl SS1/ZEN + 4882 µl MeOH

5. Souches bactériennes

Les souches bactériennes proviennent de diverses collections de bactéries lactiques : LGC Promochem, Molsheim ; Lallemand SA, Blagnac ; LGMPA, INRA Thiverval-Grignon ; LRDE INRA Corte.

Historique des souches
Les souches ont été reçues sous forme cryogénisée (Lallemand SA) ou en milieu liquide (LGPMA ; LRDE). Dans ce dernier cas, les souches ont été repiquées au laboratoire (Cf. annexe 1), puis cryogénisées pour leur conservation à long terme (Cf. annexe 2).

Souches testées au cours de cette étude :

TAXON	CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / n° coll.	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE
Lactobacillus rhamnosus	1	*Lb. rhamnosus* ATCC 53103 = **LGG**	LGC Promochem	MRS	37°C
	9	*Lb. rhamnosus*	Lallemand - R0011	MRS	37
	37	*Lb. rhamnosus*	Lallemand - R1039	MRS	37
Lactobacillus plantarum	33	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1012	MRS	37
	35	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1027	MRS	37
	40	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1051	MRS	37
	46	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1096	MRS	37
Autres *Lactobacillus*	8	*Lb.brevis*	Lallemand - R0002	MRS	37
	11	*Lb. acidophilus*	Lallemand - R0052	MRS	37
	15	*Lb. delbruekii spp bulgaricus*	Lallemand - R0149	MRS	37
	21	*Lb.reuteri*	Lallemand - R0365	MRS	37
	47	*Lb.buchneri*	Lallemand - R1102	MRS	37
	65	*Lb. helveticus*	LGMPA - 46	MRS	37
	66	*Lb. jugurti*	LGMPA - 63	MRS	37
	70	*Lb. helveticus*	LGMPA - 72	MRS	37
	95	*Lb. lactis*	LGMPA - 170	MRS	37
	101	*Lb. casei casei*	LGMPA - C3	MRS	30
Pediococcus	32	*Pediococcus acidilactici*	Lallemand - R1001	MRS	37
	39	*Pediococcus pentosaceus*	Lallemand - R1044	MRS	37
Streptococcus	34	*Streptococcus thermophilus*	Lallemand - R1018	M17	37
	143	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - NG40Z	M17	37
	144	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - B5	M17	37
Lactococcus	198	*Lc lactis*	LRDE - CS 43	M17	30
	199	*Lc lactis*	LRDE - CS 202	M17	30
	200	*Lc lactis*	LRDE - CS 197	M17	30
Leuconostoc	49	*Ln. mesenteroides*	Lallemand - R1107	MRS	30
Propionibacterium	28	*Propionibacterium*	Lallemand - R0408	YEL	30
	29	*Propionibacterium*	Lallemand - R0410	YEL	30
	30	*Propionibacterium*	Lallemand - R0501	YEL	30

III- PROTOCOLE

1. Cultures bactériennes, estimation de la concentration cellulaire et récupération des bactéries

1.1 Cultures bactériennes

Revivification des souches

Une öse de culture cryogénisée est transférée dans un tube en polypropylène diamètre 0,5 cm bouché avec du coton cardé et contenant **2 ml** de milieu de culture stérile = **pré-culture** (pour la nature du milieu et les conditions d'incubation, Cf. annexe 1.

Cultures

Les cultures sont réalisées dans des erlens de 250 ml contenant **200 ml** de milieu stérile. Chaque erlen est ensemencé avec **0,1 ml** de pré-culture et incubé dans les mêmes conditions que précédemment.

1.2 Estimation de la concentration bactérienne

Cf. annexe 3

Lors des essais pour lesquels plus de 200 ml de culture sont nécessaires, les erlens sont réunis dans un ballon de 1l ou 2l stérile. L'ensemble de la culture est homogénéisé sur agitateur magnétique avant d'effectuer les mesures.

1.3 Récupération des cellules bactériennes

Le volume de culture à centrifuger est calculé selon les besoins en cellules de chaque essai.

- Centrifugation dans des pots à centrifuger de 250 ml, **3000g, 10mn, <10°C** (Centrifugeuse SORVALL RC-5B, rotor GSA, 4300 rpm).
- Le surnageant de chaque pot est éliminé à l'aide d'un système d'aspiration sous vide.

2. Elimination du déoxynivalénol et des fumonisines B_1 et B_2 en milieu de culture

2.1 Préparation des solutions de fusariotoxines dans le milieu MRS acidifié

2.1.1. DON

Solution de contamination ST/DON : **2400 µl** de solution à **400 µg/ml** dans l'eau UHQ

- Dans un tube à hémolyse propre et neuf, évaporation à sec (45°C) de 974 µl SS1/DON sous courant d'azote
- Reprise dans 2400 µl eau UHQ
- Agitation au vortex, passage dans un bain à ultra-sons pendant 3 min, agitation au vortex.
- Conservation à 4°C

Milieu MRS + DON: 10 µg DON/ml MRS acidifié

Dans un flacon stérile, 2000 µl ST/DON + 78 ml MRS acidifié à **pH 4** avec de l'acide lactique 90%

2.1.2. FB_1-FB_2

Solution de contamination ST/FB : **2400 µl** de solution à **400 µg/ml FB_1 + 400 µg/ml FB_2** dans l'eau UHQ

- Evaporation à sec (45°C) de 480 µl SS1/FB_1 + 2800 µl SS1/FB_2
- Reprise et conservation dans les mêmes conditions que le DON

Milieu MRS + FB: 10 µg FB_1 + 10 µg FB_2/ml MRS acidifié

Dans un flacon stérile, 2000 µl ST/FB + 78 ml MRS acidifié à **pH 4** avec de l'acide lactique 90%

2.2. Déroulement de l'essai

Pour chaque souche (n=30) et chaque type de mycotoxine (n=2):

- **2 ml** de milieu MRS + toxine sont ajoutés à la totalité du culot cellulaire récupéré à partir de **200 ml** de culture
- Cette suspension est homogénéisée au vortex et distribuée dans 2 tubes en polypropylène (**1 ml/tube**) (essais en duplicate) (n=60)

Témoins

Pour chaque type de toxine, 2 tubes contenant uniquement 1 ml de milieu + toxine (**témoins sans cellules** = témoin positif) (n=4) et 1 tube contenant les cellules et 1 ml de MRS acidifié (**témoins sans toxine** = témoin négatif, 1 par genre bactérien testé) (n=6) sont préparés parallèlement aux essais.

Incubation

Tous les tubes (n=70) sont bouchés avec du coton cardé et du parafilm (conditions microaérophiles) et incubés à **30°C** pendant **1h** sous agitation continue à 480 mouvements/min (agitateur IKA KS 130 Basic), puis pendant **23h** sans agitation. Une étuve équipée d'une prise électrique à l'intérieur de l'enceinte est nécessaire.

Après la période d'incubation, les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) dans des adaptateurs 7 tubes diam. 1 cm, puis **200 µl** de surnageant sont prélevés et disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Les microtubes sont conservés à 4°C jusqu'au dosage des fusariotoxines par HPLC.

3. Effet du pH et de la viabilité des bactéries sur le niveau d'élimination des fusariotoxines

3.1 Effet du pH sur l'élimination des fusariotoxines par Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)

Valeurs de pH testées : **4** (pH d'un bon ensilage); **6** (pH d'un ensilage mal conservé); **7,4** (valeur utilisée dans des travaux antérieurs) et **7,8**

Fusariotoxines testées seules ou en association : DON, DON + NIV, ZEN, FB_1 + FB_2

3.1.1 Lavage des cellules bactériennes et distribution

$5,5 \times 10^{11}$ UFC de LGG récupérées dans un pot à centrifuger sont lavées 3 fois au tampon **PBS 0,01M, pH 7,4 :**

- 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 150 ml de PBS, centrifugation 3000g, 10mn, <5°C

- 1 lavage par ajout de 52 ml de PBS (suspension à **10^{10} UFC/ml**)

Cette suspension, maintenue en agitation sur un agitateur magnétique, est distribuée en tubes en polypropylène diam. 1 cm (**1ml/tube**). Les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) et le surnageant est éliminé avec le système d'aspiration en veillant bien à ne pas éliminer de cellules.

3.1.2 Préparation des solutions de fusariotoxines dans les tampons
Une solution est préparée dans un tube Falcon 15 ml pour chaque toxine (ou association de toxines) (n=4) et chaque valeur de pH (n=4) soit **16 solutions**.

Préparation des solutions de contamination (ST ou STM)
Dans des tubes à hémolyse :

ST / STM	Concentration toxine dans tampon (µg/ml)	Volume Tampon + toxine (ml)	Quantité de toxine nécessaire (µg)	Volume SS2 (100 µg/ml) à évaporer (µl)	Volume solvant de reprise (µl)
ST/DON	5	30	150	1500	1500 (eau UHQ)
STM/DON-NIV	5 / 5	30	150/ 150	1500/ 1500	1500 (eau UHQ)
ST/ZEN	2	30	60	600	1500 (éthanol)
STM/FB_1-FB_2	2,5 / 2,5	30	75 / 75	750 / 750	1500 (eau UHQ)

Préparation des solutions tampons avec et sans toxine
Dans des tubes Falcon 15 ml :

Toxine	Réactifs	pH 4	pH 6	pH 7,4	pH 7,8	TOTAL (µl)
Tampon + DON (5 µg/ml)	ST/DON	350	350	350	350	1400
	Tampon (µl)	6650	6650	6650	6650	26600
	Total (µl)	**7000**	**7000**	**7000**	**7000**	**28000**
Tampon + DON + NIV (5 / 5 µg/ml)	STM/DON-NIV	350	350	350	350	1400
	Tampon (µl)	6650	6650	6650	6650	26600
	Total (µl)	**7000**	**7000**	**7000**	**7000**	**28000**
Tampon + ZEN (2 µg/ml)	ST/ZEN	350	350	350	350	1400
	Tampon (µl)	6650	6650	6650	6650	26600
	Total (µl)	**7000**	**7000**	**7000**	**7000**	**28000**
Tampon + FB_1 + FB_2 (2,5 / 2,5 µg/ml)	STM/FB_1-FB_2	350	350	350	350	1400
	Tampon (µl)	6650	6650	6650	6650	26600
	Total (µl)	**7000**	**7000**	**7000**	**7000**	**28000**

2 ml de solution **sans toxine** (témoin négatif) sont préparés parallèlement pour chaque valeur de pH (n=4) :100 µl eau UHQ + 1900 µl tampon (solvant = 5%)

3.1.3 Déroulement de l'essai
1 ml de chaque solution de toxine (n =16) est ajouté à un culot cellulaire lavé contenant 10^{10} UFC LGG. Les essais sont réalisés **en triple** (n=48).

Témoins
- Pour chaque valeur de pH et pour chaque toxine, un tube en polypropylène contenant uniquement **1 ml** solution de toxine (**témoins sans cellules** = témoins positif) est préparé. Ces témoins sont également réalisés en triple (références) (n=48).
- Pour chaque valeur de pH, **1 ml** de solution sans toxine est ajouté à un culot cellulaire lavé (**témoins sans toxine** = témoin négatif) (n= 4).

Incubation
Tous les tubes (n= 100) sont incubés à **37°C** pendant **1h** sous agitation continue à 480 mvts/min.

Après la période d'incubation, les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C), puis **200 µl** de surnageant sont prélevés et disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Les microtubes sont conservés à 4°C jusqu'au dosage des fusariotoxines par HPLC.

Résumé de l'essai et codification des tubes

		N° des tubes			
		pH 4	**pH 6**	**pH 7.4**	**pH 7,8**
1- DON	Témoin sans Toxine (n=4)	1	2	3	4
	Témoin sans cellule (n=12)	5-7	8-10	11-13	14-16
	Essai (n=12)	17-19	20-22	23-25	26-28
2- DON-NIV	Témoin sans Toxine (n=4)	1	2	3	4
	Témoin sans cellule (n=12)	29-31	32-34	35-37	38-40
	Essai (n=12)	41-43	44-46	47-49	50-52
3- ZEN	Témoin sans Toxine (n=4)	1	2	3	4
	Témoin sans cellule (n=12)	53-55	56-58	59-61	62-64
	Essai (n=12)	65-67	68-70	71-73	74-76
4- FB_1-FB_2	Témoin sans Toxine (n=4)	1	2	3	4
	Témoin sans cellule (n=12)	77-79	80-82	83-85	86-88
	Essai (n=12)	89-91	92-94	95-97	98-100

3.2 Effet du pH et de la viabilité sur l'élimination des fusariotoxines par Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus (LDB) et Leuconostoc mesenteroïdes (LM)

Mêmes valeurs de pH et mêmes fusariotoxines testées qu'en III-3.1. *L'effet d'un traitement thermique de suspensions bactériennes est testé à pH 4.*

3.2.1 Lavage des cellules bactériennes et distribution

Pour chacune des 2 souches LDB et LM, **7×10^{11}** UFC sont récupérées et lavées 3 fois :

- 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 200 ml PBS, et centrifugation 3000g, 10mn, <10°C
- 1 lavage par ajout de 70 ml de PBS (suspension à **10^{10} UFC/ml**)

15 ml de chacune des 2 suspensions sont prélevés et transférés dans un tube en verre 18x180 pour le traitement thermique des bactéries.

Le reliquat de chaque suspension est distribué dans des tubes en polypropylène (**1 ml/tube**) (n=52 par souche) puis les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) et les surnageants sont éliminés.

3.2.2 Traitement thermique des suspensions bactériennes

- Les tubes contenant 15 ml de chaque suspension bactérienne sont placés dans un bain-marie à **100°C** pendant **1 h**, puis refroidies sous l'eau froide.
- Les suspensions sont ensuite homogénéisées au vortex et distribuées dans des tubes en polypropylène (**1 ml/tube**) (n=13 par souche). Les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) et les surnageant sont éliminés.

3.2.3 Préparation des solutions de fusariotoxines dans les tampons

Préparation des solutions de contamination (ST ou STM)

Dans des tubes à hémolyse :

ST / STM	**Concentration toxine dans tampon (µg/ml)**	**Volume Tampon + toxine (ml)**	**Quantité de toxine nécessaire (µg)**	**Volume SS2 (100 µg/ml) à évaporer (µl)**	**Volume solvant de reprise (µl)**
ST/DON	5	50	250	2500	2500 (eau UHQ)
STM/DON-NIV	5 / 5	50	250 / 250	2500 / 2500	2500 (eau UHQ)
ST/ZEN	2	50	100	1000	2500 (éthanol)
STM/FB_1-FB_2	2,5 / 2,5	50	125 / 125	1250 / 1250	2500 (eau UHQ)

Préparation des solutions tampons avec et sans toxine
Dans des tubes Falcon 15 ml ou 50 ml selon le volume :

	Réactifs	pH 4	pH 6	pH 7,4	pH 7,8	TOTAL (µl)
Tampon + DON (5 µg/ml)	ST/DON	800	500	500	500	2300
	Tampon (µl)	15200	9500	9500	9500	43700
	Total (µl)	**16000**	**10000**	**10000**	**10000**	**46000**
Tampon + DON + NIV (5 / 5 µg/ml)	STM/DON-NIV	800	500	500	500	2300
	Tampon (µl)	15200	9500	9500	9500	43700
	Total (µl)	**16000**	**10000**	**10000**	**10000**	**46000**
Tampon + ZEN (2 µg/ml)	ST/ZEN	800	500	500	500	2300
	Tampon (µl)	15200	9500	9500	9500	43700
	Total (µl)	**16000**	**10000**	**10000**	**10000**	**46000**
Tampon + FB_1 + FB_2 (2,5 / 2,5 µg/ml)	STM/FB_1-FB_2	800	500	500	500	2300
	Tampon (µl)	15200	9500	9500	9500	43700
	Total (µl)	**16000**	**10000**	**10000**	**10000**	**46000**

Des solutions **sans toxine** (témoin négatif) sont préparés parallèlement pour chaque valeur de pH (n=4) (solvant = 5%) :

	Réactifs	pH 4	pH 6	pH 7,4	pH 7,8	TOTAL (µl)
Tampon sans toxine	Eau UHQ (µl)	250	150	150	150	700
	Tampon (µl)	4750	2850	2850	2850	13300
	Total (µl)	**5000**	**3000**	**3000**	**3000**	**14000**

3.2.4 Déroulement de l'essai

- Pour chaque valeur de pH, **1 ml** de solution de toxine est ajouté à un culot cellulaire lavé contenant 10^{10} UFC **viables** de chaque souche. Les essais sont réalisés **en triple** (n=96).
- **1 ml** de solution de toxine dans le tampon pH 4 est ajouté à un culot cellulaire contenant 10^{10} UFC de chaque souche traitée thermiquement (**non viables**). Les essais sont réalisés **en triple** (n=24).

Témoins

- Pour chaque valeur de pH et pour chaque type de toxine, un tube en polypropylène contenant uniquement **1 ml** solution de toxine (**témoins sans cellules** = témoins positif) est préparé. Ces témoins sont également réalisés en triple (références) (n=48).
- Pour chaque valeur de pH et chaque souche, **1 ml** de solution sans toxine est ajouté à un culot de cellules viables de chaque souche (**témoins sans toxine** = témoin négatif) (n= 8). Un témoin sans toxine est également préparé avec les cellules non viables de chaque souche dans le tampon pH 4 (n=2)

Incubation
Tous les tubes (n= 178) sont incubés à **37°C** pendant **1h** sous agitation continue à 480 mvts/min.

Après la période d'incubation, les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C), puis **200 µl** de surnageant sont prélevés et disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Les microtubes sont conservés à 4°C jusqu'au dosage des fusariotoxines par HPLC.

Résumé de l'essai et codification des tubes

	Souche		N° des tubes			
			pH 4	**pH 6**	**pH 7.4**	**pH 7,8**
1- DON	**-**	Témoin sans cellule (n=12)	1-3	4-6	7-9	10-12
	LDB	Témoin sans Toxine CV (n=4)	13	14	15	16
		Essai CV (n=12)	17-19	20-22	23-25	26-28
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	29	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	30-32	-	-	-
	LM	Témoin sans Toxine CV (n=4)	33	34	35	36
		Essai CV (n=12)	37-39	40-42	43-45	46-48
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	49	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	50-52	-	-	-
2- DON-NIV	**-**	Témoin sans cellule (n=12)	53-55	56-58	59-61	62-64
	LDB	Témoin sans Toxine CV (n=4)	13	14	15	16
		Essai CV (n=12)	65-67	68-70	71-73	74-76
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	29	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	77-79	-	-	-
	LM	Témoin sans Toxine CV (n=4)	33	34	35	36
		Essai CV (n=12)	80-82	83-85	86-88	89-91
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	49	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	92-94	-	-	-
3- ZEN	**-**	Témoin sans cellule (n=12)	95-97	98-100	101-103	104-106
	LDB	Témoin sans Toxine CV (n=4)	13	14	15	16
		Essai CV (n=12)	107-109	110-112	113-115	116-118
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	29	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	119-121	-	-	-
	LM	Témoin sans Toxine CV (n=4)	33	34	35	36
		Essai CV (n=12)	122-124	125-127	128-130	131-133
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	49	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	134-136	-	-	-
4- FB_1-FB_2	**-**	Témoin sans cellule (n=12)	137-139	140-142	143-145	146-148
	LDB	Témoin sans Toxine CV (n=4)	13	14	15	16
		Essai CV (n=12)	149-151	152-154	155-157	158-160
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	29	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	161-163	-	-	-
	LM	Témoin sans Toxine CV (n=4)	33	34	35	36
		Essai CV (n=12)	164-166	167-169	170-172	173-175
		Témoin sans Toxine CNV (n=1)	49	-	-	-
		Essai CNV (n=3)	176-178	-	-	-

LDB : *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (code souchier 15)

LM : *Leuconostoc mesenteroides* (code souchier 49)

CV: Cellules viables

CNV: Cellules non viables

4. Effet de la concentration bactérienne sur l'élimination du déoxynivalénol, de la zéaralénone et des fumonisines B_1 et B_2 en infusât de maïs acidifié par LGG, LDB et LM

4.1 Préparation des suspensions bactériennes et traitement des cellules

Pour chacune des 3 souches LGG, LDB et LM, **$1,5 \times 10^{11}$** UFC sont récupérées et lavées 3 fois :

- 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 50 ml de PBS, puis centrifugation 3000g , 10mn, <10°C
- 1 lavage par ajout de 15 ml de PBS (suspension à **10^{10} UFC/ml**)

*Suspension à **10^9 UFC/ml*** : 1 ml de suspension à 10^{10} UFC/ml + 9 ml PBS
*Suspension à **10^8 UFC/ml*** : 1 ml de suspension à 10^9 UFC/ml + 9 ml PBS
*Suspension à **10^7 UFC/ml*** : 1 ml de suspension à 10^8 UFC/ml + 9 ml PBS

Les suspensions sont homogénéisées au vortex, distribuées dans des tubes en polypropylène (**1 ml/tube**) puis les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) et les surnageants sont éliminés.

4.2 Préparation des solutions de fusariotoxines en infusât de maïs acidifié

Les volumes de solutions de toxines suivants sont évaporés à sec (45°C) dans des tubes à hémolyse :

- 456,9 µl SS1/DON (soit 450 µg)
- 106,1 µl SS1/ZEN (soit 450 µg)
- 225 µl SS2/FB_1 + 135 µl SS2/FB_2 (soit 450 µg de chaque FB)

La ZEN est reprise dans 2250 µl d'éthanol, et le DON et le mélange de FB sont repris dans 2250 µl d'eau UHQ (solutions à **200 µg/ml**)

Ensuite, les solutions de toxines sont incorporées à l'infusât de la façon suivante :
2100 µl + 39900 µl infusât de maïs acidifié à pH 4 (solutions à **10 µg toxine/ml**)

4.3 Déroulement de l'essai

- Pour chaque souche et chaque type de toxine, **1 ml** de solution de toxine en infusât est ajouté à un culot cellulaire contenant **10^7, 10^8, 10^9 et 10^{10} UFC/ml**. Les essais sont réalisés **en triple** (n=108).

Témoins

- Pour chaque type de toxine, un tube en polypropylène contenant uniquement **1 ml** solution de toxine (**témoins sans cellules** = témoins positif) est préparé. Ces témoins sont également réalisés **en triple** (références) (n=9).
- Pour chaque souche, **1 ml** d'infusât de maïs, 5% solvant est ajouté à un culot de cellules conteant 10^{10} UFC/ml (**témoins sans toxine** = témoin négatif) (n= 3).

Incubation

Tous les tubes (n= 120) sont bouchés avec du coton cardé et du parafilm, incubés à **30°C** pendant **1h sous agitation** continue à 480 mvts/mn, puis **23h à 30°C sans agitation**.

Après la période d'incubation, les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C), puis **200 µl** de surnageant sont prélevés et disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Les microtubes sont conservés à 4°C jusqu'au dosage des fusariotoxines par HPLC.

4.4 Résumé de l'essai et codification des tubes

Toxine	Souche		N° des tubes			
			10^7 UFC.ml^{-1}	10^8 UFC.ml^{-1}	10^9 UFC.ml^{-1}	10^{10} UFC.ml^{-1}
DON		Témoin sans cellules (n=3)	1-3			
	LGG	Témoin sans toxine (n=1)				4
		Essais (n=12)	7-9	10-12	13-15	16-18
	LDB	Témoin sans toxine (n=1)				5
		Essais (n=12)	19-21	22-24	25-27	28-30
	LM	Témoin sans toxine (n=1)				6
		Essais (n=12)	31-33	34-36	37-39	40-42
ZEN		Témoin sans cellules (n=3)	43-45			
	LGG	Témoin sans toxine (n=1)				4
		Essais (n=12)	46-48	49-51	52-54	55-57
	LDB	Témoin sans toxine (n=1)				5
		Essais (n=12)	58-60	61-63	64-66	67-69
	LM	Témoin sans toxine (n=1)				6
		Essais (n=12)	70-72	73-75	76-78	79-81
FB_1 – FB_2		Témoin sans cellules (n=3)	82-84			
	LGG	Témoin sans toxine (n=1)				4
		Essais (n=12)	85-87	88-90	91-93	94-96
	LDB	Témoin sans toxine (n=1)				5
		Essais (n=12)	97-99	100-102	103-105	106-108
	LM	Témoin sans toxine (n=1)				6
		Essais (n=12)	109-111	112-114	115-117	118-120

5. Effet du stade de croissance de LGG sur l'élimination de la zéaralénone et des fumonisines B_1 et B_2

5.1 Stades de croissance testés

Stade de croissance	Code stade	DO_{600} relative* ($1/5^{ème}$) = cible	Temps incubation (h)	Conc. bactérienne estimée (UFC/ml)	Nombre tubes (10^{10}UFC/tube)	Volume culture
Début phase exponentielle	1	0,17		1×10^8	6	600
Milieu phase exponentielle	2	0,43		$2,5 \times 10^8$	6	240
Fin phase exponentielle	3	0,87		5×10^8	6	120
Début phase stationnaire	4		24		7 **	140
Fin phase stationnaire	5		48		6	120
Total					32	1240

* valeurs cibles de DO_{600} relative (après dilution au $1/5^{ème}$ dans le bouillon MRS stérile)
** 1 tube supplémentaire (témoin sans toxine)

5.2 Cultures, mesures turbidimétriques et arrêt des incubations

1800 ml de bouillon MRS dans des erlens de 250 ml (9 erlens; 200 ml/erlen) sont ensemencés de façon homogène à partir d'une pré-culture de LGG.

La DO_{600} relative est mesurée toutes les heures à partir de 12 h d'incubation, puis toutes les ½ heures au début de la phase exponentielle de croissance afin de stopper l'incubation aux stades de croissance souhaités (stades 1 à 3).

L'incubation de 4 erlens (800 ml) est arrêtée à DO_{600} relative = **0,17*** (stade 1)
L'incubation de 2 erlens (400 ml) est arrêtée à DO_{600} relative = **0,43*** (stade 2)
L'incubation de 1 erlen (200 ml) est arrêtée à DO_{600} relative = **0,87*** (stade 3)
L'incubation de 1 erlen (200 ml) est arrêtée **après 24h** d'incubation (stade 4)
L'incubation de 1 erlen (200 ml) est arrêtée **après 48h** d'incubation (stade 5)
* Après dilution au $1/5^{ème}$ dans le bouillon MRS stérile

Si un léger écart de DO est observé par rapport à la valeur cible, le volume de culture à centrifuger est corrigé pour récupérer la quantité de cellules souhaitées.

5.3 Lavage des cellules bactériennes et distribution

A chaque stade, **6×10^{10} UFC** de LGG (**7×10^{10} UFC** au stade 4) récupérées dans un pot à centrifuger sont lavées 3 fois avec du tampon PBS 0,01M, pH 7,4 :

- 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 20 ml de PBS, puis centrifugation 3000g , 10mn, <10°C
- 1 lavage par ajout de 6 ml de PBS (7 ml au stade 4) (suspensions à **10^{10} UFC/ml**)

Les suspensions sont distribuées dans des tubes en polypropylène (**1 ml/tube** = 10^{10} cellules), puis les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) et le surnageant est éliminé avec le système d'aspiration en veillant bien à ne pas éliminer de cellules.

La codification des tubes est la suivante :
Code stade – toxine – n° répétition

5.4 Préparation des solutions de fusariotoxines

Préparation des solutions de contamination (ST ou STM)
Dans des tubes à hémolyse :

ST	Conc. toxine dans tampon pH 4 (µg/ml)	Volume Tampon + toxine (ml)	Quantité de toxine nécessaire (µg)	Volume SS2 (100 µg/ml) évaporé (µl)	Volume solvant de reprise (µl)
ST/ZEN	2	20	40	400	1000 (éthanol)
STM/FB_1-FB_2	2,5 / 2,5	20	50 / 50	500 / 500	1000 (eau UHQ)

Préparation des solutions avec et sans toxine
Dans des Falcon 50 ml :

	Réactifs	Volume (µl)
Solution sans toxine	Eau UHQ (µl)	100
	Tampon pH 4 (µl)	1900
	Total (µl)	**2000**
Tampon + ZEN	ST/ZEN	950
	Tampon pH 4 (µl)	18050
	Total (µl)	**19000**
Tampon + FB_1 + FB_2	STM/FB_1-FB_2	950
	Tampon pH 4 (µl)	18050
	Total (µl)	**19000**

5.5 Déroulement de l'essai

Pour chaque stade (n = 5) et chaque type de toxine (n = 2), **1 ml** de solution de toxine en milieu tampon est ajouté à un culot cellulaire lavé contenant 10^{10} UFC. Les essais sont réalisés **en triple** (n = 30).

Témoins
Pour chaque chaque type de toxine, un tube en polypropylène contenant uniquement **1 ml** solution de toxine (**témoins sans cellules** = témoins positif) est préparé. Ces témoins sont réalisés **en triple** (références) (n = 6). Un témoin contenant 1 ml de solution **sans toxine** et 10^{10} UFC LGG est également préparé (n=1) (témoin négatif).

Incubation
Tous les tubes (n= 38) sont incubés à **37°C** pendant **1h** sous agitation continue à 480 mvts/mn.

Après la période d'incubation, les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C), puis **200 µl** de surnageant sont prélevés et disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Les microtubes sont conservés à 4°C jusqu'au dosage des fusariotoxines par HPLC.

6. Dosage des fusariotoxines

Pour le dosage des toxines dans l'infusât de maïs acidifié, Cf. annexe 4.
Pour les autres matrices, les conditions sont décrites ci-dessous.

6.1 Conditions chromatographiques

Toxine	Colonne	Phase mobile	Débit	λ nm	Vol. inj.	Tps analyse
DON NIV	**7** (Macherey-Nagel CC/125/4.6 nucleodur C18, 5µm)	ACN-ED (8/92)	1 ml/min	220 et 230 (UV)	20 µl	10 min
ZEN	**8** (MN CC 125/3 nucleodur C18, 5µm)	ED-MeOH (40:60)	1,2 ml/min	λ exc: 274 λ em: 440	50 µl	9 min
FB_1-FB_2	**4** (Bishoff, Prontosil, 125x4.6, 3 µm)	**A:** NaH_2PO_4 0.05M-MeOH (50:50) ajusté à pH 3,35 avec H_3PO_4 pur **B:** Acétonitrile **Gradient** : 10% à 60% (B) en 6 mn 60% (B) pendant 7 mn 60% à 10% (B) en 1 mn 10% (B) pendant 1 mn	1 ml/min	λ exc: 336 λ em: 440	20 µl	15 mn

6.2 Dosage du DON et du NIV

- Pour le dosage du DON dans le milieu MRS, le surnageant est dilué au 1/10ème dans la phase mobile avant injection.
- Pour le dosage du DON et du NIV dans les solutions tampons, le surnageant est injecté directement.

6.3 Dosage de la ZEN

- Pour le dosage de la ZEN dans les solutions tampons, le surnageant est dilué au ½ dans le méthanol avant injection.
- Pour le dosage de la ZEN dans les autres matrices, le surnageant est injecté directement

6.4 Dosage de la FB_1 et de la FB_2

90 µl de tampon borate 0,1 M, pH 10 sont ajoutés à 10 µl d'échantillon à analyser (dilution au 1/10ème). Ensuite 100 µl de réactif de dérivatisation* sont ajoutés (t = 0). A t = 20 secondes, le vial est mélangé au vortex pendant 10 secondes. L'analyse est lancée à t = 2 mn (Start).

* Préparation du réactif de dérivatisation : Cf. annexe 4.

7. Expression des résultats

$$\text{Fraction éliminée (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Aire de pic}_{\text{essai}}}{\text{Aire de pic}_{\text{témoin sans cellules}}}\right)$$

Laboratoire des MYCOTOXINES **URH-DIMA**	**PROTOCOLE**
	Réf : PROT-URH-DIMA/criblage souches
	Rédigé le 12/05/2005
	Validé le 15/05/2005
OBJET : Criblage de bactéries fermentaires pour leur capacité à séquestrer et/ou biotransformer les fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 en infusât de maïs acidifié	
Auteur du document : Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☐ Technicien(s) ☒ Stagiaire(s) ☒ Responsable(s)	

SOMMAIRE

I- OBJECTIF **2**

II- MATERIELS ET REACTIFS **2**
1. Matériels 2
2. Milieux et réactifs 2
3. Tampon de lavage des cellules bactériennes (PBS) 2
4. Solutions stock de fusariotoxines 2
5. Souches bactériennes 3

III- PROTOCOLE **3**
1. Cultures bactériennes, estimation de la concentration cellulaire, récupération et lavage des bactéries 3
2. Préparation des solutions de fusariotoxines 4
3. Déroulement de l'essai 4
4. Dosage des fusariotoxines 5
5. Expression des résultats 5

I- OBJECTIF

L'objectif de ce travail est de cribler un grand nombre (n=200) de souches des bactéries fermentaires (lactiques et propioniques) issues de diverses collections pour leur capacité à séquestrer et/ou biotransformer la zéaralénone (ZEN), les fumonisines B_1 et B_2 (FB_1 et FB_2) en infusât de maïs acidifié au pH de l'ensilage.

II- MATERIELS ET REACTIFS

1. Materiels

- Matériels des modes opératoires (MO) suivants :
  - *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 1)
  - *Conservation des souches de bactéries fermentaires par cryogénisation* (annexe 2)
  - *Méthode turbidimétrique pour l'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 3)
  - *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié* (annexe 4)
- Matériels du protocole *Elim. Fusariotoxines* — Annexe 7
- Chaîne HPLC + logiciel acquisition Karat — Réf : Beckman

2. Milieux et réactifs

- Milieux de culture des bactéries fermentaires (Cf. annexe 1)
- Infusât de maïs acidifié (Cf. annexe 4)
- Réactifs (Cf. annexe 4)
- Déoxynivalénol — Réf : SIGMA D-0156
- Zéaralénone — Réf : SIGMA Z-2125
- Fumonisine B_1 — Réf : SIGMA F-1147
- Fumonisine B_2 — Réf : SIGMA F-3771
- Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) — Réf : RP Normapur 28 027.262
- Chlorure de sodium (NaCl) (g) — Réf : RP Normapur 27 808.297
- Sodium di-hydrogénophosphate (NaH_2PO_4) — Réf : RP Normapur 28 013.264

3. Tampon de lavage des cellules bactériennes (PBS)

Le tampon de lavage est du PBS en solution saline (NaCl = 0,145 M ; pH = 7,1-7,2)

Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) (g)	1,07
Sodium di-hydrogénophosphate (NaH_2PO_4, 2 H_20) (g)	0,39
Chlorure de sodium (NaCl) (g)	8,50
Eau distillée	qsp 1l

Autoclaver 15 mn à 121°C.

4. Solutions stock de fusariotoxines

4.1. <u>Déoxynivalénol</u> (DON)

Reconstitution solution stock de DON (27/09/2004, lot 034K4023) dans l'acétonitrile (ACN) = **SS1/DON** (**#1 mg/ml**)

<u>*Dosage spectrophotométrique*</u> :
50 µl SS1/DON + 450 µl ACN
Puis, 200 µl de cette solution + 400 µl ACN
DO_{218nm} = 0,710

[**SS1/DON**] = 0,710 × 46,25 × 3 × 10 = **985 µg/ml**

<u>*Préparation solution stock à **400 µg/ml** (SS2/DON)*</u>
2030 µl SS1/DON + 2969 µl ACN

4.2 <u>Zéaralénone (ZEN)</u>

Reconstitution solution stock de ZEN (02/09/2004, lot 122K4068) dans le MeOH = **SS1/ZEN**

Dosage spectrophotométrique :
50 µl SS1/ZEN + 450 µl MeOH
Puis, 20 µl de cette solution + 480 µl MeOH
DO_{274} = 0,741

[**SS1/ZEN**] = 0,741 × 22,89 × 25 × 10= **4240 µg/ml**

*Préparation solution stock à **400 µg/ml** (SS2/ZEN)*
472 µl SS1/ZEN + 4528 µl MeOH

4.3. Fumonisines B_1 et B_2 (FB_1 et FB_2)
Reconstitution solutions stocks FB_1 (12/10/2004, lot 033K4007) et FB_2 (17/11/2004, lot 073K1507) avec un volume précis de mélange ACN/eau (1/1) (pas de scan possible)

[SS1/FB_1] = 2000 µg/ml : 10 mg FB_1 + 5 ml ACN/eau (1/1) par pesée
[SS1/FB_2] = 3333 µg/ml : 10 mg FB_2 + 3 ml ACN/eau (1/1) par pesée

*Préparation solution stock à **400 µg/ml** (SS2/FB_1 et SS2/FB_2)*
SS2/FB_1: 800 µl SS1/FB_1 + 3200 µl ACN/eau (1/1)
SS2/FB_2: 480 µl SS1/FB2 + 3520 µl ACN/eau (1:1)

5. Souches bactériennes

Les souches bactériennes proviennent de diverses collections de bactéries lactiques : LGC Promochem, Molsheim ; Lallemand SA, Blagnac ; LGMPA, INRA Thiverval-Grignon ; URF INRA Aurillac ; LMG, CNRS FRE 2326 Strasbourg ; LRDE, INRA Corte.

Historique des souches
Les souches ont été reçues sous forme cryogénisée (Lallemand SA), lyophilisée (LGC Promochem), en milieu liquide (LGPMA ; LMG ; LRDE) ou sur boites de Pétri (URF). Dans ces trois derniers cas, les souches ont été repiquées au laboratoire (Cf. MO *culture des principaux genres de bactéries fermentaires*), puis cryogénisées pour leur conservation à long terme (Cf. annexe 2).

Liste des souches de bactéries fermentaires testées au cours de cette étude
Se référer à l'annexe 9.

III- PROTOCOLE

1. Cultures bactériennes, estimation de la concentration cellulaire, récupération et lavage des bactéries

1.1 Cultures bactériennes
Revivification des souches
Une öse de culture cryogénisée est transférée dans un tube en polypropylène diamètre 0,5 cm bouché avec du coton cardé et contenant **2 ml** de milieu de culture stérile = **pré-culture** (pour la nature du milieu et les conditions d'incubation, Cf. annexe 1.

Cultures
Les cultures sont réalisées dans des tubes en verre 16 × 160 stériles contenant **20 ml** de milieu stérile. Chaque tube est ensemencé avec **0,1 ml** de pré-culture et incubé dans les mêmes conditions que précédemment.

1.2 Estimation de la concentration bactérienne
Cf. annexe 3

1.3 Récupération des cellules bactériennes
Pour chaque souche, un volume de culture contenant **35 × 10^8 UFC** est transféré dans un tube Falcon 15 ml et centrifugé (3000g, 10mn, <10°C) (Centrifugeuse SORVALL RC-5B, rotor GSA, 4300 rpm). Le surnageant est éliminé à l'aide d'un système d'aspiration sous vide.

1.4 Lavage des cellules bactériennes et distribution

Les cellules de chaque souche sont lavées 3 fois avec du PBS en conditions stériles (hotte microbiologique ou bec bunsen).

- 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 5 ml de PBS, puis centrifugation 3000g , 10mn, <10°C
- 1 lavage par ajout de 7 ml de PBS (suspension à **5×10^8 UFC/ml**)

Cette suspension, maintenue en agitation sur un agitateur magnétique, est distribuée dans 6 tubes* en polypropylène diam. 1 cm (**1ml/tube**). Les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C) et le surnageant est éliminé avec le système d'aspiration en veillant bien à ne pas éliminer de cellules.
* Pour une souche par genre bactérien, distribuer un tube supplémentaire (témoin sans toxine)

2. Préparation des solutions de fusariotoxines

Préparation pour le criblage de **20 souches** (nombre de souches testées par semaine)

*Préparation des solutions de contamination (ST ou STM) à **100 µg/ml***
Dans des tubes à hémolyse :

ST / STM	Concentration toxine dans infusât (µg/ml)	Volume infusât + toxine (ml)	Quantité de toxine nécessaire (µg)	Volume SS2 (400 µg/ml) à évaporer* (µl)	Volume solvant de reprise (µl)
ST/DON	5	50	270	675	2700 (eau UHQ)
ST/ZEN	5	50	270	675	2700 (éthanol)
STM/FB_1-FB_2	5 / 5	50	270 / 270	675 / 675	2700 (eau UHQ)

Les solutions de toxines (SS2) sont évaporées à sec (45°C) sous courant d'azote

Après ajout du solvant de reprise, les solutions sont agitées au vortex, passées 3 mn dans un bain à ultra-sons et agitées à nouveau au vortex. Ces solutions sont conservées à 4°C.

Préparation des solutions de toxine dans l'infusât de maïs acidifié : **5 µg/ml**
Les solutions de contamination sont incorporées à l'infusât de maïs de la façon suivante :
2500 µl + 47500 µl infusât de maïs acidifié à pH 4 avec de l'acide lactique (solvant = 5%)

Préparation des solutions d'infusât sans toxine (témoins négatifs)

- Pour le dosage de la **ZEN** : infusât 5% éthanol :
  250 µl éthanol + 4750 µl infusât de maïs acidifié
- Pour le dosage du **DON** et des **FB** : infusât 5% eau UHQ
  250 µl eau UHQ stérile + 4750 µl infusât de maïs acidifié

3. Déroulement de l'essai

Pour chaque souche testée et chaque type de toxine, **1 ml** de solution de toxine en infusât est ajouté à un culot cellulaire lavé contenant 5×10^8 UFC. Les essais sont réalisés **en duplicate** (n = 60).

Témoins

- Pour chaque type de toxine, un tube en polypropylène contenant uniquement **1 ml** solution de toxine (**témoins sans cellules** = témoins positif) est préparé. Ces témoins sont réalisés **en triple** (références) (n = 9).
- Pour chaque genre de bactérie fermentaire testé, **1 ml** de solution sans toxine est ajouté à un culot bactérien contenant 5×10^8 UFC (**témoins sans toxine** = témoin négatif).

Incubation
Tous les tubes sont bouchés avec du coton cardé et du parafilm (microaérophilie) et incubés à **25°C** pendant 1h sous agitation continue à 480 mvts/min, puis pendant **23h sans agitation**.

Après la période d'incubation, les tubes sont centrifugés (3000g , 10mn, <10°C), puis **200 µl** de surnageant sont prélevés et disposés dans des microtubes de 1,5 ml. Les microtubes sont conservés à 4°C jusqu'au dosage des fusariotoxines par HPLC.

4. Dosage des fusariotoxines

Se référer à l'annexe 4.

5. Expression des résultats

$$\text{Fraction éliminée (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Aire de pic}_{\text{essai}}}{\text{Aire de pic}_{\text{témoin sans cellules}}}\right)$$

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
1	*Lb. Rhamnosus* ATCC 53103	LGC Promochem	MRS	37	22 ± 4	5 ± 0	12 ± 0	19 ± 2
8	*Lb.brevis*	Lallemand - R0002	MRS	37	59 ± 1	7 ± 1	17 ± 8	17 ± 6
9	*Lb. casei ssp rhamnosus*	Lallemand - R0011	MRS	37	18 ± 5	21 ± 7	10 ± 1	27 ± 0
10	*Lb. casei ssp rhamnosus*	Lallemand - R0049	MRS	37	8 ± 0	nd	nd	9 ± 2
11	*Lb. acidophilus*	Lallemand - R0052	MRS	37	20 ± 1	11 ± 5	26 ± 6	21 ± 2
12	*Lactococcus lactis ssp lactis*	Lallemand - R0058	M17	30	17 ± 4	12 ± 1	14 ± 10	25 ± 3
13	*Lactococcus lactis ssp cremoris*	Lallemand - R0065	M17	30	12 ± 0	8 ± 2	33 ± 6	27 ± 0
14	*Lactococcus lactis ssp lactis var diacetylactis*	Lallemand - R0100	M17	30	12 ± 2	9 ± 3	11 ± 0	0 ± 0
15	*Lb. delbruekii spp bulgaricus*	Lallemand - R0149	MRS	37	31 ± 4	10 ± 7	31 ± 12	18 ± 3
16	*Lb. delbruekii spp bulgaricus*	Lallemand - R0152	MRS	37	22 ± 1	16 ± 3	14 ± 2	0 ± 0
17	*Lb. delbruekii spp lactis*	Lallemand - R0230	MRS	37	18 ± 1	11 ± 4	12 ± 3	7 ± 6
18	*Lb. delbruekii spp lactis*	Lallemand - R0233	MRS	37	29 ± 1	12 ± 0	33 ± 4	25 ± 1
19	*Lb.fermentum*	Lallemand - R0363	MRS	37	35 ± 5	10 ± 6	35 ± 3	21 ± 4
20	*Lb.fermentum*	Lallemand - R0364	MRS	37	24 ± 1	9 ± 1	44 ± 2	13 ± 5
21	*Lb.reuteri*	Lallemand - R0365	MRS	37	17 ± 1	21 ± 0	37 ± 1	15 ± 5
22	*Lb. delbruekii spp bulgaricus*	Lallemand - R0370	MRS	37	30 ± 2	7 ± 2	27 ± 8	2 ± 1
23	*Lb. acidophilus*	Lallemand - R0376=R1002	MRS	37	24 ± 0	9 ± 0	10 ± 8	24 ± 3
24	*Lactococcus lactis ssp lactis var diacetylactis*	Lallemand - R0380	M17	30	17 ± 2	13 ± 3	29 ± 1	20 ± 7
25	*Lactococcus lactis ssp lactis*	Lallemand - R0381	M17	30	14 ± 0	9 ± 3	9 ± 3	14 ± 0
26	*Lactococcus lactis ssp cremoris*	Lallemand - R0382	M17	30	16 ± 1	3 ± 3	13 ± 1	11 ± 1
27	*Lactococcus lactis ssp lactis*	Lallemand - R0383	M17	30	16 ± 1	12 ± 6	21 ± 5	14 ± 1
28	*Propionibacterium*	Lallemand - R0408	YEL	30	15 ± 5	19 ± 0	24 ± 8	14 ± 4
29	*Propionibacterium*	Lallemand - R0410	YEL	30	8 ± 3	5 ± 2	3 ± 1	14 ± 6
30	*Propionibacterium*	Lallemand - R0501	YEL	30	10 ± 0	nd	16 ± 7	25 ± 3
31	*Propionibacterium*	Lallemand - R0502	YEL	30	9 ± 1	nd	16 ± 2	26 ± 7
32	*Pediococcus acidilactici*	Lallemand - R1001	MRS	37	18 ± 2	1 ± 1	10 ± 5	25 ± 1
33	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1012	MRS	37	20 ± 0	15 ± 2	12 ± 6	nd
34	*Streptococcus thermophilus*	Lallemand - R1018	M17	37	42 ± 0	18 ± 6	50 ± 6	8 ± 1
35	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1027	MRS	37	23 ± 0	17 ± 5	53 ± 2	12 ± 1
36	*Lb.casei*	Lallemand - R1028	MRS	37	14 ± 4	18 ± 8	14 ± 8	18 ± 2
37	*Lb. casei ssp rhamnosus*	Lallemand - R1039	MRS	37	23 ± 3	10 ± 5	18 ± 0	19 ± 6
38	*Propionibacterium*	Lallemand - R1042	YEL	30	6 ± 2	5 ± 1	17 ± 7	13 ± 4
39	*Pediococcus pentosaceus*	Lallemand - R1044	MRS	37	15 ± 2	6 ± 5	26 ± 9	15 ± 4

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
40	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1051	MRS	37	23 ± 2	14 ± 4	15 ± 5	21 ± 5
41	*Lactococcus lactis*	Lallemand - R1058	M17	30	14 ± 2	12 ± 1	18 ± 1	18 ± 1
43	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1078	MRS	37	23 ± 1	13 ± 2	8 ± 5	22 ± 1
44	*Lb.casei*	Lallemand - R1085	MRS	37	18 ± 1	13 ± 2	43 ± 0	17 ± 3
45	*Lb.bulgaricus*	Lallemand - R1086	MRS	37	31 ± 2	8 ± 4	23 ± 3	21 ± 6
46	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1096	MRS	37	18 ± 2	9 ± 0	28 ± 2	18 ± 3
47	*Lb.buchneri*	Lallemand - R1102	MRS	37	22 ± 0	12 ± 5	12 ± 3	8 ± 3
48	*Lb.buchneri*	Lallemand - R1103	MRS	37	22 ± 0	11 ± 2	41 ± 6	0 ± 0
49	*Leuconostoc mesenteroides*	Lallemand - R1107	MRS	30	32 ± 11	1 ± 0	15 ± 2	17 ± 2
50	*Lb.brevis*	Lallemand - R1110	MRS	30	21 ± 1	9 ± 1	16 ± 4	18 ± 4
51	*Lb.plantarum*	Lallemand - R1113	MRS	37	59 ± 1	nd	nd	7 ± 2
52	*Lb.brevis*	Lallemand - L62	MRS	30	48 ± 2	13 ± 3	41 ± 2	27 ± 2
53	*Lb.plantarum arabinosus*	Lallemand - HO2	MRS	30	19 ± 1	6 ± 2	15 ± 1	23 ± 0
56	*Lb. fermenti*	LGMPA - 16	MRS	37	23 ± 3	0 ± 0	19 ± 9	15 ± 7
58	*Lb. fermenti*	LGMPA - 18	MRS	37	17 ± 0	7 ± 2	21 ± 7	23 ± 0
59	*Lb. acidophilus*	LGMPA - 19	MRS	37	24 ± 0	7 ± 2	8 ± 6	17 ± 3
60	*Lb. bulgaricus*	LGMPA - 21	MRS	37	26 ± 1	19 ± 3	33 ± 5	16 ± 5
61	*Lb. jugurti*	LGMPA - 22	MRS	37	19 ± 4	7 ± 5	nd	30 ± 1
62	*Lb. fermenti*	LGMPA - 34	MRS	37	43 ± 1	5 ± 1	30 ± 4	25 ± 1
66	*Lb. jugurti*	LGMPA - 63	MRS	37	27 ± 4	17 ± 3	48 ± 1	22 ± 2
68	*Lb. helveticus*	LGMPA - 70	MRS	37	18 ± 4	13 ± 2	40 ± 4	20 ± 2
70	*Lb. helveticus*	LGMPA - 72	MRS	37	20 ± 6	nd	nd	3 ± 1
71	*Lb. fermenti*	LGMPA - 76	MRS	37	19 ± 6	3 ± 1	16 ± 2	3 ± 1
72	*Lb. acidophilus*	LGMPA - 77_1	MRS	37	20 ± 3	nd	nd	31 ± 2
73	*Lb. helveticus*	LGMPA - 77_2	MRS	37	20 ± 2	nd	nd	15 ± 0
74	*Lb. helveticus*	LGMPA - 80	MRS	37	20 ± 7	4 ± 0	16 ± 4	14 ± 2
75	*Lb. helveticus*	LGMPA - 83	MRS	37	17 ± 1	21 ± 1	37 ± 5	28 ± 5
76	*Lb. helveticus*	LGMPA - 84	MRS	37	19 ± 0	6 ± 0	27 ± 1	21 ± 1
77	*Lb. helveticus*	LGMPA - 88	MRS	37	17 ± 3	nd	nd	19 ± 5
78	*Lb. helveticus*	LGMPA - 100	MRS	37	22 ± 1	12 ± 0	36 ± 4	12 ± 0
80	*Lb. jugurti*	LGMPA - 121	MRS	37	16 ± 0	19 ± 0	34 ± 9	nd
81	*Lb. jugurti*	LGMPA - 123	MRS	37	14 ± 0	3 ± 2	23 ± 3	nd
82	*Lb. fermenti*	LGMPA - 130	MRS	37	16 ± 1	5 ± 2	11 ± 9	8 ± 7

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
83	*Lb. jugurti*	LGMPA - 132	MRS	37	17 ± 2	4 ± 1	27 ± 0	23 ± 4
85	*Lb. fermenti*	LGMPA - 136	MRS	37	15 ± 2	20 ± 2	34 ± 3	7 ± 1
86	*Lb. acidophilus*	LGMPA - 139	MRS	37	15 ± 2	21 ± 3	36 ± 1	22 ± 15
87	*Lb. fermenti*	LGMPA - 140	MRS	37	14 ± 2	20 ± 0	29 ± 2	5 ± 1
88	*Lb. jugurti*	LGMPA - 144	MRS	37	17 ± 3	20 ± 2	31 ± 8	20 ± 8
89	*Lb. acidophilus*	LGMPA - 146	MRS	37	13 ± 2	21 ± 2	26 ± 3	20 ± 10
90	*Lb. acidophilus*	LGMPA - 147	MRS	37	17 ± 4	7 ± 2	26 ± 7	19 ± 0
91	*Lb. helveticus* ou *fermenti*	LGMPA - 155	MRS	37	16 ± 4	5 ± 1	26 ± 8	27 ± 1
92	*Lb. bulgaricus* ou *jugurti*	LGMPA - 156	MRS	37	23 ± 7	5 ± 0	31 ± 1	25 ± 0
94	*Lb. jugurti*	LGMPA - 1601	MRS	37	21 ± 2	12 ± 2	42 ± 2	4 ± 2
95	*Lb. lactis*	LGMPA - 170	MRS	37	19 ± 1	3 ± 2	23 ± 8	26 ± 1
96	*Lb. fermenti*	LGMPA - 1701	MRS	37	23 ± 1	12 ± 3	45 ± 2	nd
97	*Lb. bulgaricus* ou *jugurti*	LGMPA - 1706	MRS	37	16 ± 1	9 ± 2	33 ± 0	3 ± 2
98	*Lb. casei casei*	LGMPA - A1	MRS	30	16 ± 1	4 ± 0	20 ± 1	27 ± 1
99	*Lb. casei casei*	LGMPA - A2	MRS	30	17 ± 1	9 ± 2	31 ± 2	8 ± 4
100	*Lb. casei casei*	LGMPA - B1	MRS	30	52 ± 2	16 ± 6	51 ± 4	1 ± 1
101	*Lb. casei casei*	LGMPA - C3	MRS	30	17 ± 3	14 ± 0	38 ± 1	18 ± 1
102	*Lb. casei casei*	LGMPA - C7	MRS	30	18 ± 3	12 ± 3	27 ± 6	22 ± 0
103	*Lb. brevis*	LGMPA - C11	MRS	30	59 ± 4	1 ± 1	32 ± 6	21 ± 1
104	*Lb. buchneri*	LGMPA - E7	MRS	30	17 ± 2	10 ± 3	32 ± 6	nd
105	*Lb. plantarum*	LGMPA - F4	MRS	30	21 ± 2	7 ± 4	25 ± 2	9 ± 3
106	*Lb.* hétérofermentaire	LGMPA - F7	MRS	30	41 ± 2	4 ± 2	18 ± 5	19 ± 0
107	*Lb. plantarum*	LGMPA - J1	MRS	30	50 ± 2	12 ± 0	44 ± 8	nd
108	*Lb. plantarum*	LGMPA - J3	MRS	30	29 ± 2	12 ± 1	28 ± 2	21 ± 1
110	*Lb. casei casei*	LGMPA - J8	MRS	30	18 ± 1	12 ± 1	20 ± 0	3 ± 1
111	*Lb. plantarum*	LGMPA - J11	MRS	30	20 ± 0	17 ± 1	31 ± 0	14 ± 0
112	*Lb. casei*	LGMPA - J13	MRS	30	11 ± 5	6 ± 2	22 ± 4	0 ± 0
113	*Lb. plantarum*	LGMPA - J15	MRS	30	18 ± 1	15 ± 2	27 ± 1	5 ± 6
114	*Lb. plantarum*	LGMPA - K2	MRS	30	14 ± 1	18 ± 0	34 ± 10	nd
115	*Lb.*	LGMPA - L2-4	MRS	30	23 ± 1	14 ± 1	28 ± 3	27 ± 7
116	*Lb.*	LGMPA - L2-6	MRS	30	23 ± 2	17 ± 4	30 ± 5	6 ± 1
117	*Lb. plantarum*	LGMPA - L6	MRS	30	17 ± 1	13 ± 1	29 ± 4	3 ± 0
118	*Lb. casei casei*	LGMPA - M3	MRS	30	19 ± 1	15 ± 5	24 ± 4	29 ± 0

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
119	*Lb. casei casei*	LGMPA - M4	MRS	30	15 ± 1	14 ± 0	23 ± 1	20 ± 4
120	*Lb. casei casei*	LGMPA - M6	MRS	30	15 ± 1	15 ± 4	30 ± 2	15 ± 1
121	*Lb. casei casei*	LGMPA - M8	MRS	30	16 ± 0	12 ± 0	21 ± 4	6 ± 0
122	*Lb. plantarum*	LGMPA - N5	MRS	30	15 ± 1	10 ± 0	24 ± 1	6 ± 8
123	*Lb. plantarum*	LGMPA - O6	MRS	30	20 ± 2	9 ± 5	18 ± 10	11 ± 5
124	*Lb. plantarum*	LGMPA - O11	MRS	30	19 ± 0	8 ± 2	29 ± 6	7 ± 7
125	*Lb. casei casei*	LGMPA - O16	MRS	30	17 ± 1	7 ± 5	20 ± 8	26 ± 6
126	*Lb. plantarum*	LGMPA - P1	MRS	30	20 ± 2	9 ± 0	27 ± 2	18 ± 0
127	*Lb. casei casei*	LGMPA - P5	MRS	30	19 ± 2	12 ± 2	30 ± 4	20 ± 2
128	*Lb. plantarum*	LGMPA - P10	MRS	30	15 ± 1	9 ± 1	25 ± 2	1 ± 0
129	*Lb. brevis*	LGMPA - P13	MRS	30	19 ± 1	13 ± 4	29 ± 2	13 ± 1
130	*Lb. casei*	LGMPA - P16	MRS	30	21 ± 1	19 ± 7	nd	12 ± 3
131	*Lb. plantarum*	LGMPA - R3	MRS	30	18 ± 1	16 ± 2	25 ± 5	19 ± 5
132	*Lb. casei casei*	LGMPA - R5	MRS	30	21 ± 2	9 ± 4	5 ± 7	27 ± 5
133	*Lb. plantarum*	LGMPA - R6	MRS	30	20 ± 1	14 ± 4	21 ± 4	13 ± 5
134	*Lb. casei alactosus*	LGMPA - S2	MRS	30	18 ± 1	3 ± 3	9 ± 0	10 ± 2
135	*Lb. plantarum*	LGMPA - S5	MRS	30	20 ± 1	6 ± 1	10 ± 0	12 ± 0
136	*Lb. casei casei*	LGMPA - S9	MRS	30	24 ± 1	3 ± 2	nd	26 ± 3
137	*Lb. plantarum*	LGMPA - S13	MRS	30	25 ± 0	5 ± 2	nd	14 ± 2
138	*Lb. casei*	LGMPA - T9	MRS	30	23 ± 4	6 ± 2	15 ± 6	17 ± 11
139	*Lb. casei casei*	LGMPA - T13	MRS	30	22 ± 1	2 ± 1	14 ± 2	16 ± 4
140	*Lb. casei casei*	LGMPA - X4	MRS	30	25 ± 0	7 ± 0	18 ± 2	26 ± 1
141	*Lb. plantarum*	LGMPA - a	MRS	30	22 ± 7	3 ± 1	5 ± 2	11 ± 0
142	*Lb. plantarum*	LGMPA - 3	MRS	30	22 ± 3	2 ± 0	15 ± 9	19 ± 9
143	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - NG40Z	M17	37	34 ± 1	17 ± 0	41 ± 2	25 ± 5
146	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - S154	M17	37	40 ± 1	24 ± 3	57 ± 3	16 ± 2
148	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - AC09	M17	37	39 ± 0	17 ± 1	58 ± 2	13 ± 2
149	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - 170	M17	37	43 ± 1	20 ± 1	44 ± 0	17 ± 1
150	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - 222	M17	37	36 ± 1	24 ± 3	59 ± 4	24 ± 5
153	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - C3	M17	37	31 ± 0	16 ± 2	55 ± 1	nd
154	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - C27	M17	37	39 ± 0	16 ± 2	43 ± 2	19 ± 3
155	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - C302	M17	37	37 ± 0	13 ± 2	45 ± 14	26 ± 3
156	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - C308	M17	37	37 ± 0	19 ± 1	60 ± 1	18 ± 6

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
157	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y1	M17	37	31 ± 0	17 ± 0	40 ± 0	23 ± 2
158	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y6	M17	37	36 ± 1	18 ± 4	39 ± 3	20 ± 1
159	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y22	M17	37	39 ± 1	18 ± 3	52 ± 2	11 ± 0
160	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y44	M17	37	40 ± 0	18 ± 4	35 ± 3	27 ± 1
161	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y305	M17	37	40 ± 1	13 ± 4	52 ± 1	30 ± 2
162	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - T3	M17	37	36 ± 0	7 ± 4	38 ± 10	6 ± 1
163	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - T8	M17	37	36 ± 0	9 ± 0	38 ± 6	17 ± 2
164	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y32	M17	37	39 ± 1	5 ± 2	50 ± 1	17 ± 1
166	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y9	M17	37	38 ± 0	6 ± 2	39 ± 0	17 ± 0
167	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - C28	M17	37	43 ± 1	9 ± 0	53 ± 1	16 ± 1
168	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - C309	M17	37	48 ± 1	14 ± 1	45 ± 3	21 ± 7
169	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - F1	M17	37	45 ± 1	17 ± 1	54 ± 4	8 ± 0
170	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - RAR1	M17	37	49 ± 1	16 ± 3	60 ± 7	18 ± 1
172	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y23	M17	37	40 ± 1	15 ± 5	42 ± 16	19 ± 0
173	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - Y26	M17	37	42 ± 1	19 ± 3	51 ± 3	nd
175	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - 224	M17	37	48 ± 7	14 ± 3	55 ± 6	33 ± 0
176	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - 229	M17	37	38 ± 0	12 ± 1	48 ± 5	9 ± 0
177	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - 256	M17	37	39 ± 2	17 ± 2	59 ± 5	1 ± 0
178	*Streptococcus thermophilus*	LGMPA - 298	M17	37	45 ± 1	15 ± 1	62 ± 3	nd
189	*Lactobacillus*	LGMPA - 13b	MRS	37	20 ± 1	nd	nd	18 ± 11
190	*Lactobacillus*	LGMPA - 108	MRS	37	20 ± 2	3 ± 1	15 ± 3	27 ± 0
198	CS 43 Lactococcus lactis	INRA-LRDE	M17	30	19 ± 1	8 ± 1	10 ± 3	20 ± 0
199	CS 202 Lc lactis	INRA-LRDE	M17	30	24 ± 6	11 ± 2	12 ± 0	17 ± 3
200	CS 197 Lc lactis	INRA-LRDE	M17	30	23 ± 0	14 ± 1	21 ± 4	17 ± 3
201	CS 512 Lc lactis ssp lactis biovar diacetylactis	INRA-LRDE	M17	30	19 ± 0	13 ± 3	21 ± 0	26 ± 2
202	CS 542 Lc lactis	INRA-LRDE	M17	30	17 ± 9	20 ± 2	31 ± 1	29 ± 0
203	CS 1000 Lc lactis	INRA-LRDE	M17	30	18 ± 2	8 ± 3	30 ± 4	3 ± 2
204	CS 1069 Lc lactis ssp lactis biovar diacetylactis	INRA-LRDE	M17	30	16 ± 3	11 ± 2	22 ± 1	20 ± 1
206	CS 1215 Lc lactis	INRA-LRDE	M17	30	25 ± 7	10 ± 0	15 ± 2	23 ± 1
207	CS 1264 Lc lactis	INRA-LRDE	M17	30	14 ± 1	16 ± 4	9 ± 6	26 ± 0
209	Lb paraplantarum - CIP 104445 (61D)	CNRS - FRE2326	MRS	30	19 ± 0	14 ± 7	17 ± 9	9 ± 0
210	Lb paraplantarum - ATCC 10776 (CNRZ 1888)	CNRS - FRE2326	MRS	30	21 ± 1	3 ± 0	8 ± 2	10 ± 3
211	Lb paraplantarum - CST 10961 (CNRZ 1885)	CNRS - FRE2326	MRS	30	20 ± 1	2 ± 0	2 ± 0	4 ± 0

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
212	Lb paraplantarum - CNRZ 745	CNRS - FRE2326	MRS	30	25 ± 3	2 ± 1	4 ± 3	4 ± 0
213	Lb paraplantarum - H41	CNRS - FRE2326	MRS	30	26 ± 5	4 ± 2	14 ± 6	28 ± 13
214	Lb paraplantarum - H43	CNRS - FRE2326	MRS	30	22 ± 2	7 ± 2	16 ± 5	14 ± 0
215	Lb paraplantarum - H48	CNRS - FRE2326	MRS	30	23 ± 2	2 ± 1	7 ± 1	22 ± 2
216	Lb plantarum - DSM 2648	CNRS - FRE2326	MRS	30	17 ± 3	nd	nd	11 ± 3
217	Lb plantarum - FB101	CNRS - FRE2326	MRS	30	19 ± 1	12 ± 2	29 ± 5	33 ± 2
218	Lb plantarum - CNRZ 738J	CNRS - FRE2326	MRS	30	22 ± 2	10 ± 0	33 ± 0	24 ± 0
219	Lb plantarum - NCIMB 6105 notée NCIMB 6104	CNRS - FRE2326	MRS	30	18 ± 0	5 ± 2	21 ± 5	20 ± 2
220	Lb plantarum - NCIMB 7220	CNRS - FRE2326	MRS	30	17 ± 3	6 ± 2	13 ± 0	8 ± 0
221	Lb plantarum - CIP 71.39	CNRS - FRE2326	MRS	30	21 ± 0	5 ± 5	17 ± 9	5 ± 0
222	Lb plantarum - CIP 104453	CNRS - FRE2326	MRS	30	13 ± 1	9 ± 3	16 ± 9	11 ± 6
223	Lb plantarum - CCM 1904	CNRS - FRE2326	MRS	30	19 ± 2	8 ± 2	29 ± 2	30 ± 4
224	Lb plantarum - CNRZ 424	CNRS - FRE2326	MRS	30	15 ± 1	6 ± 3	15 ± 1	0 ± 0
225	Lb plantarum - CNRZ 432	CNRS - FRE2326	MRS	30	17 ± 2	4 ± 3	14 ± 4	2 ± 2
226	Lb plantarum - CST11031	CNRS - FRE2326	MRS	30	20 ± 2	10 ± 2	20 ± 2	0 ± 0
227	Lb plantarum - CST11019	CNRS - FRE2326	MRS	30	19 ± 0	20 ± 2	30 ± 5	19 ± 1
228	Lb plantarum - CST10928	CNRS - FRE2326	MRS	30	23 ± 0	13 ± 4	36 ± 4	13 ± 5
229	Lb plantarum - DK9	CNRS - FRE2326	MRS	30	13 ± 0	3 ± 0	7 ± 1	20 ± 2
230	Lb plantarum - LP85-2	CNRS - FRE2326	MRS	30	17 ± 2	5 ± 1	17 ± 4	26 ± 2
231	Lb plantarum - NCIMB 8299 (NCFB 1193)	CNRS - FRE2326	MRS	30	17 ± 3	5 ± 1	16 ± 7	28 ± 12
232	Lb plantarum - FB115	CNRS - FRE2326	MRS	30	15 ± 4	5 ± 4	13 ± 0	1 ± 1
233	Lb plantarum - CNRZ 739	CNRS - FRE2326	MRS	30	19 ± 0	6 ± 2	24 ± 0	0 ± 0
234	Lb plantarum - LMG 18035 noté CST 10928	CNRS - FRE2326	MRS	30	18 ± 2	13 ± 1	8 ± 6	15 ± 3
235	Lb plantarum - B41	CNRS - FRE2326	MRS	30	18 ± 1	6 ± 4	16 ± 1	9 ± 2
236	Lb pentosus - NCFB 363	CNRS - FRE2327	MRS	30	23 ± 2	4 ± 1	32 ± 4	2 ± 2
238	Ln mesenteroïdes Ln Pseudomesenteroïdes - 171	URF - Aurillac	MRS	30	37 ± 3	nd	nd	17 ± 2
239	Lb plantarum - 359	URF - Aurillac	MRS	37	23 ± 2	4 ± 1	26 ± 0	16 ± 10
240	Ln mesenteroïdes Ln gelidum, Ln kimchii, pseudomes - 365	URF - Aurillac	MRS	30	28 ± 2	nd	10 ± 6	19 ± 3
242	Ln mesenteroïdes - 403	URF - Aurillac	MRS	30	32 ± 0	8 ± 5	24 ± 2	15 ± 3
244	Strep. Macedonius - 674	URF - Aurillac	M17	37	40 ± 1	5 ± 0	27 ± 2	16 ± 0
246	Strep. Macedonius - 683	URF - Aurillac	M17	37	41 ± 0	15 ± 3	46 ± 0	23 ± 0

CODE SOUCHIER	IDENTIFICATION	SOURCE / N° SOUCHE	MILIEU DE CULTURE	T° OPTIMALE CROISSANCE (°C)	FRACTION ELIMINEE (%)			
					ZEN	FB1	FB2	DON
248	Enterococcus faecium - 712	URF - Aurillac	M17	37	39 ± 2	20 ± 1	57 ± 3	16 ± 2
250	Enterococcus faecalis - 735	URF - Aurillac	M17	37	35 ± 1	15 ± 1	43 ± 1	25 ± 3
254	Ent faecalis - 1087	URF - Aurillac	M17	37	35 ± 1	18 ± 0	38 ± 1	34 ± 1
258	Ln mesenteroides - 1118	URF - Aurillac	MRS	30	42 ± 1	nd	38 ± 4	18 ± 3
265	Ln mesenteroides - 1232	URF - Aurillac	MRS	30	20 ± 2	4 ± 2	30 ± 5	24 ± 3
270	Ent faecium - 745a	URF - Aurillac	M17	37	32 ± 1	3 ± 1	35 ± 7	14 ± 4

Laboratoire des MYCOTOXINES **URH-DIMA**	**PROTOCOLE**
	Réf : PROT-URH-DIMA/Transf. ZEN - 3α–HSD
	Rédigé le 26/09/2005
	Validé le 11/10/2005
OBJET : Essais de transformation de la zéaralénone en α zéaralénol par la 3α–HSD de *Comamonas testosteroni* en milieu tampon et en infusât de maïs acidifié	
Auteur du document : Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☐ Technicien(s) ☒ Stagiaire(s) ☒ Responsable(s)	

SOMMAIRE

I- OBJECTIF **2**

II- MATERIELS ET REACTIFS **2**
1. Matériels 2
2. Milieux et réactifs 2
3. Préparation des solutions tampons 2
4. Reconstitution et conservation de l'enzyme 2
5. Préparation de la solution β-NADH 0,02 M 2
6. Solution de zéaralénone à 100 µg/ml 3

III- PROTOCOLE **3**
1. Essai 1 : transformation en milieu tampon pH 6,5 3
2. Essai 2 : transformation en infusât de maïs acidifié 3
3. Conditions chromatographiques 3

I. OBJECTIF

L'objectif de ce travail est de vérifier l'hypothèse selon laquelle la 3α-hydroxystéroïde déshydrogénase (3α–HSD) de *Comamonas testosteroni* pourrait transformer la zéaralénone (ZEN) en α zéaralénol (α ZOL) en présence de cofacteur β-NADH. Ces essais sont réalisés en milieu tampon et en infusât de maïs acidifié.

II- MATERIELS ET REACTIFS

1. Materiels

- Matériels du mode opératoire (MO) *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié* (annexe 4)
- Matériels du protocole *Elim. Fusariotoxines* — Annexe 7
- Chaîne HPLC + logiciel acquisition Karat — Réf : Beckman

2. Milieux et réactifs

- Milieux et réactifs du mode opératoire (MO) *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié* (annexe 4)
- Enzyme 3α –HSD — Réf: Sigma H-1506
- Co-facteur β-NADH — Réf : Sigma N-8129
- Di-potassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4) — Réf : PROLABO 26 930.293
- Potassium di-hydrogénophosphate (KH_2PO_4) — Réf : PROLABO 26 925.295
- Sérumalbumine bovine (BSA) — Réf : INRA (Microbiologie)

3. Préparation des solutions tampons

<u>*Tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7,2*</u>

Solution 1: Potassium phosphate, monobasic 0,01 M (PM KH_2PO_4 = 136.09 g/mol)

KH_2PO_4	0,136 g
Eau UHQ	qsp 100 ml

Solution 2 : Potassium phosphate, dibasic 0,01 M (PM K_2HPO_4 = 174 g/mol)

K_2HPO_4	0,174 g
Eau UHQ	qsp 100 ml

Une électrode de pH est plongée dans la solution de K_2HPO_4 placée sous agitation, puis la solution de KH_2PO_4 est ajoutée jusqu'à pH 7,2.

<u>*Préparation tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5*</u>

K_2HPO_4	0,952 g
Na_2HPO_4	0,425 g
Eau UHQ	qsp 100 ml

Contrôle pH = **6,51**

4. Reconstitution et conservation de l'enzyme

L'enzyme 3α –HSD est reprise dans le tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 7,2 auquel est ajouté **0,5% BSA** pour amélioree sa conservation (recommandations fournisseur).

- **50 mg BSA** sont mélangés extemporanément dans **10 ml tampon**
- **4 ml** du mélange tampon + BSA sont ajoutés dans le flacon d'enzyme (50 UI) soit une solution à **12,5 UI/ml**
- La solution enzymatique est mélangée par retournements successifs, puis aliquotée en microtubes : 200 µl/microtube.
- Conservation des aliquots à **-20°C**

5. Préparation de la solution β-NADH 0,02 M

Le co-facteur β-NADH étant instable dans le tampon phosphate 0,1 M (pH 6,5), il doit être préparé extemporanément à chaque utilisation.

*Concentration β-NADH finale (essais) : **1 mM***
10^{-3} mole β-NADH/l ↔ 10^{-6} mole/ml essai
Volume solution β-NADH: 50 µl /ml essai
Soit 10^{-6} mole dans 50 µl ↔ **2 x 10^{-5} mole/ml (0,02 M)**
PM β-NADH = 727,42 g/mol

Pour 500 µl : dissoudre **7,275 mg** NADH dans 500 µl de **tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5**

6. Solution de zéaralénone à 100 µg/ml

A partir de la solution SS2/ZEN-001-04 (400 µg/ml dans le méthanol)
100 µl SS2/ZEN+ **300 µl** Eau UHQ

III. PROTOCOLE

1. Essai 1 : transformation en milieu tampon pH 6,5

- L'essai est réalisé dans un volume total de **2 ml** :

Réactif	Essai 1		Témoin sans enzyme - NADH	
	Concentration	Volume (µl)	Concentration	Volume (µl)
3α-HSD 12,5 UI/ml (µl)	0,5 UI/ml	80		
β-NADH 0,02 M (µl)	1 mM	100		
Tampon phosphate 0,1M pH 6,5		1720		1900
ZEN 100 µg/ml (µl)	5 µg/ml (0,0156 mM)	100	5 µg/ml (0,0156 mM)	100
Temps d'incubation	30 mn, 1h, 2h			

- *Déroulement de l'essai*
  - Ajout de l'enzyme puis du β-NADH dans le tampon
  - Agitation douce (1800 rpm sur vortex)
  - Ajout de la solution de ZEN au complexe 3α-HSD / β-NADH
  - Agitation douce (1800 rpm sur vortex)
- **Un témoin sans ZEN** (mêmes conditions que l'essai en remplaçant la solution de ZEN par 100 µl de mélange Méthanol/ED 1:3) est réalisé afin de vérifier qu'il n'y a pas d'interférence des réactifs sur le dosage de la ZEN et de ses métabolites.
- **Un témoin sans le complexe 3α-HSD / β-NADH** (mêmes conditions que l'essai en remplaçant les solutions de 3α-HSD et β-NADH par du tampon pH 6,5) est également réalisé (témoin négatif)
- Les tubes sont incubés dans un bain marie à **25°C sans agitation** pendant **30 mn, 1h et 2h**
- Après chaque temps d'incubation, 150 µl sont prélevés dans chaque tube pour analyse.

2. Essai 2 : transformation en infusât de maïs acidifié

Cet essai est réalisé dans les mêmes conditions que l'essai 1 en apportant les modifications suivantes :

- Remplacement du tampon phosphate pH 6,5 par de **l'infusât de maïs acidifié à pH 4 avec de l'acide lactique**
- Temps d'incubation = **2h, 4h et 24h**

3. Conditions chromatographiques

Toxine	Colonne	Phase mobile	Débit ml/min	λ nm	Vol. Inj. (µl)	Tps analyse (mn)
ZEN α ZOL	**3** (Bischoff, 125 x 4,6 mm ; Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm)	MeOH – Ac acétique 1% (65:35)	1	λ_{exc}: 274 nm λ_{em}: 440 nm	20	12

Laboratoire des MYCOTOXINES **URH-DIMA**	**PROTOCOLE**
	Réf : PROT-URH-DIMA/Stabilité complexe
	Rédigé le 22/11/2005
	Validé le 28/11/2005
OBJET : Etude de la stabilité du complexe *Streptococcus* – zéaralénone dans le jus de rumen et dans un environnement simulant le tractus gastro-intestinal des ruminants *in vitro*	
Auteur du document : Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☐ Technicien(s) ☐ Stagiaire(s) ☒ Responsable(s)	

SOMMAIRE

I- OBJECTIF **2**

II- MATERIELS ET REACTIFS **2**
1. Matériels 2
2. Milieux et réactifs 2
3. Préparation des solutions tampons 2
4. Préparation des solutions d'incubation (conditions abomasum et intestin) 3
5. Solutions stock de zéaralénone, α et β zéaralénols 3
6. Souches bactériennes 3

III- PROTOCOLE **4**
1. Cultures bactériennes, estimation de la concentration cellulaire et récupération des bactéries 4
2. Stabilité du complexe Streptococcus – zéaralénone dans le jus de rumen 4
3. Stabilité du complexe Streptococcus – zéaralénone dans des conditions simulant l'abomasum et l'intestin 5
4. Stabilité du complexe jus de rumen – zéaralénone dans des conditions simulant l'abomasum et l'intestin 6
5. Analyses 7

I- OBJECTIF

L'objectif de ce travail est d'étudier la stabilité du complexe *Streptococcus* – zéaralénone au cours d'un cycle de fermentation ruminale et dans des conditions simulant les compartiments post-ruminaux (abomasum et intestin grêle) du tractus digestif des ruminants *in vitro*.

II- MATERIELS ET REACTIFS

1. Materiels

- Matériels des modes opératoires (MO) suivants :
  - *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 1)
  - *Conservation des souches de bactéries fermentaires par cryogénisation* (annexe 2)
  - *Méthode turbidimétrique pour l'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 3)
- Matériels du protocole *Elim. fusariotoxines* — Annexe 7
- Chaîne HPLC + logiciel acquisition Karat — Réf : Beckman
- Colonne n°3 : 125 x 4,6 mm ; Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm — Réf : Bischoff
- Tubes de Hungate — Réf : Labo des fermentations
- Système de mesure de la production de gaz — Réf : Labo des fermentations

2. Milieux et réactifs

- Réactifs du protocole *Elim. Fusariotoxines* — Annexe 7
- Jus de rumen de 3 moutons (alimentés au foin) mis à jeun de nourriture et d'eau pendant 24h — Réf : Annexe élevage INRA
- Substrat végétal d'incubation du jus de rumen : 50% foin de luzerne, 50% maïs grain (forme sèche broyée) — Réf : Labo des fermentations
- Zéaralénone — Réf : Sigma Z-2125
- α zéaralénol — Réf : Sigma Z0166
- β zéaralénol — Réf : Sigma Z2000
- Pepsine — Réf : Sigma P 7012
- Lysozyme — Réf : Sigma 62970
- Pancréatine — Réf : Sigma P 7545
- Bile bovine — Réf : Sigma B 3883
- Glycine — Réf : Sigma G 7126
- HCl — Réf : RP Normapur 20 252.290
- Acide citrique ($C_6H_8O_7$, 1 H_20) — Réf : RP Normapur 28 278.232
- Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) — Réf : RP Normapur 28 027.262
- Acide phosphorique (H_3PO_4) — Réf : SIGMA P-6560
- Réactifs composant le tampon d'incubation du jus de rumen selon Goering & Vansoest — Réf : méthode n°397 AQ URH

3. Préparation des solutions tampons

Tampon glycine 0,1 M / HCl ***pH 2,5***

Solution A : glycine 0,2 M

Glycine 1,501 g

Eau distillée qsp 100 ml

Solution B : HCl 0,2 M

1ml HCl 37% + 49 ml ED

Pour 100 ml :

25 ml solution A

14,1 ml solution B

qsp 100 ml eau distillée

Tampons citrate 0,1M / phosphate ***pH 4 ; pH 6 et pH 7***

Solution A : composition pour 1l

Acide citrique ($C_6H_8O_7$, 1 H_20) (g) 21,01

Eau distillée qsp 1l

Solution B : composition pour 1l
Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) (g) 28,4
Eau distillée qsp 1l

- Tampon **pH 4**
  62,0 ml solution A + 38,0 ml solution B
- Tampon **pH 6**
  37,4 ml solution A + 62,6 ml solution B
- Tampon **pH 7**
  17,35 ml solution A + 82,65 ml solution B

Ces solutions tampon sont autoclavées (121°C, 15 min).
Le pH est vérifié avant et après autoclavage.

Tampon d'incubation du jus de rumen (selon Goering & Van Soest)
300 ml de tampons sont préparés selon la méthode n°397 (base AQ URH)

4. Préparation des solutions d'incubation (conditions abomasum et intestin)

Solution de pepsine
1 g/l pepsine (2000 FIP-U /g) en tampon **pH 2,5** (vache laitière)
Dissoudre **20 mg** de pepsine dans **20 ml** de tampon pH 2,5

Solution de lysozyme
3000 U/ml lysozyme en tampon **pH 6** (Dominguez-Bello et al, 2004 ; Dobson et al 1984)
Dissoudre **30 mg** de lysozyme de blanc d'œuf de poule (100 000 U/mg) dans **100 ml** tampon pH 6 (30000 U/ml)
Puis, **1 ml** de cette solution **+ 9 ml** tampon pH 6 (3000 U/ml)

Solution de pancréatine
3 g/l pancréatine en tampon **pH 7** (Ward et Spears 1993)
Dissoudre **60 mg** de pancréatine dans **20 ml** tampon pH 7

Solution de bile bovine
0,3% soit **3 g/l** bile bovine en tampon **pH 7** (Begley et al, 2002 ; Gilliland et, 1984)
Dissoudre **60 mg** de bile bovine dans 20 ml tampon **pH 7**

Mélange de pancréatine et de bile bovine
3 g/l pancréatine + **3 g/l** bile bovine en tampon **pH 7**
Dissoudre **60 mg** pancréatine et **60 mg** bile bovine dans **20 ml** tampon pH 7

5. Solutions stock de zéaralénone, α et β zéaralénols

Solution stock de zéaralénone
Reconstitution solution stock de ZEN (07/11/2004, lot 122K4068) dans le méthanol = **SS1/ZEN**
Aliquots = SS1 dans des vials ambrés, 1 mg ZEN: SS1-ZEA001-n°aliquot

Solution stock de α-zéaralénol
Reconstitution solution stock de α-ZOL (21/06/2005, lot 034K4074) dans le méthanol = **SS1/α-ZOL (1 mg/ ml)**

Solution stock de β-zéaralénol
Reconstitution solution stock de β-ZOL (21/06/2005, lot 034K4074) dans le méthanol = **SS1/β-ZOL (1 mg/ ml)**

6. Souches bactériennes

Les souches bactériennes sélectionnées pour cet essai sont :

- ***Streptococcus thermophilus* RAR1** (LGMPA, INRA Thiverval-Grignon), souche qui a présenté le taux maximal de séquestration de la ZEN lors du criblage de souches (49%)
- ***Streptococcus bovis*** (Laboratoire de microbiologie, INRA Theix), espèce fréquente dans le contenu ruminal.

III- PROTOCOLE

1. Cultures bactériennes, estimation de la concentration cellulaire et récupération des bactéries

Se référer au point III-1 du protocole Elim. Fusariotoxines (annexe 7).

2. Stabilité du complexe Streptococcus – zéaralénone dans le jus de rumen

Ces essais sont réalisés avec les 2 souches bactériennes *Streptococcus thermophilus* RAR1 et *Streptococcus bovis*. Le complexe *Streptococcus*-ZEN est incubé dans du jus de rumen avec ou sans substrat végétal, en anaérobiose, pendant 0 et 18h à 39°C. Un contrôle avec de la ZEN libre (non préalablement complexée aux *Streptococci*) est réalisé dans les mêmes conditions. A T = 0 et à l'issue des incubations, les fractions libres et liées sont déterminées. Les essais sont réalisés en triple.

2.1 Préparation de la solution de zéaralénone

Deux aliquots de solution stock de ZEN (SS1-ZEN001-001 et 002) sont évaporés à sec et repris directement par 1000 µl d'éthanol, agités au vortex, passé 3 min dans un bain à ultra-sons et à nouveau agité au vortex. Les deux aliquots sont ensuite rassemblés dans un même vial ambré (solution à 1 mg/ml)

Solution de ZEN en tampon pH 4 = ST/ZEN ***(180 ml, 5 µg/ml)***

900 µl de SS1-ZEN à 1 mg/ml sont directement transférés dans un flacon en verre de 250 ml préalablement stérilisé.

1350 µl d'éthanol puis **177,75 ml** tampon pH 4 sont ensuite ajoutés (1,25% éthanol dans la solution finale).

2.2 Formation des complexes Streptococcus – zéaralénone

Pour chacune des 2 souches :

- **5×10^{10} UFC** sont récupérées et lavées 3 fois :
  - * 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 15 ml de PBS 0,01M, pH 7,4, puis centrifugation à 3000g, 10 min, <10°C
  - * 1 lavage par ajout de 100 ml de PBS (suspension à 5×10^8 UFC/ml).
- **5 ml** (25 x 10^8 UFC) de cette suspension maintenue en agitation sur un agitateur magnétique sont distribués dans des tubes de Hungate (n = 17)
- Les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min, <10°C) et le surnageant est éliminé avec le système d'aspiration en veillant bien à ne pas éliminer de cellules
- **5 ml** de ST/ZEN sont ajoutés à chaque culot bactérien et homogénéisés par agitation au vortex
- Les tubes sont incubés **1h à 25°C** sous agitation (480 mvts/min)
- Tous les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min, <10°C)
- 3 tubes sont utilisés pour déterminer la fraction de ZEN séquestrée
- Le surnageant des autres tubes est éliminé

2.3 Déroulement de l'essai

J-1 :

- Trois moutons fistulés avant la prise d'aliment et alimentés en foin sont mis à jeun de nourriture et d'eau
- **30 doses de 50 mg** de substrat végétal sec (50% foin de luzerne, 50% maïs grain) sont préparées dans des microtubes 1,5 ml

J0 :

- Des jus de rumen (JR) prélevés sur les 3 moutons, sont mélangés à égal volume pour former un « pool ». Ce "pool-JR" est dilué avec du tampon de Goering & Vansoest dans les proportions **1:2**, et le pH est mesuré après homogénéisation.
- Pour chacune des 2 souches, **une dose** de substrat et **5 ml** de JR-tampon sont ajoutés sous un courant de CO_2 dans 6 tubes de *Hungate* contenant le complexe (n = 12) (Cf. tableau en III-2.4)
- Pour chaque temps d'incubation (T=0 et T = 18h), **des contrôles** i) stabilité toxine (sans bactéries, sans JR et sans substrat) (n = 6), ii) sans bactéries, avec ZEN ou α-ZOL (n = 12), iii) sans toxine (n = 4), iv) sans substrat sont réalisés (n= 12) (Cf. tableau en III-2.4)

Les contrôles sans bactéries et le témoin stabilité toxine (i) sont contaminés avec 12,5 µl de SS1/ZEN ou SS1/α-ZOL (1 mg/ml) correspondant à la fraction de ZEN séquestrée par les *Streptococci* (50%).

- A T = 0, tous les tubes sont homogénéisés
- Les tubes T = 0 sont directement centrifugés (3000g, 10 min) et les fractions de ZEN libre et liée sont déterminées
- Les autres tubes sont fermés et mis à incuber immédiatement en agitation (60 mvts/min) à **39°C** pendant **18h** (n = 6).
- Après la période d'incubation, la **production de gaz** est déterminée avant ouverture des tubes
- Les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min), puis **2 ml** de surnageant sont additionnés de 0,2 ml de H_3PO_4 à 5% v/v et stockés à **4°C** pour l'analyse des AGV
- Les fractions libres et liées de ZEN, α-ZOL et β-ZOL sont dosée directement sur le surnageant et sur le culot après extraction, respectivement

2.4. Tableau : Résumé des traitements

	ZEA	Substrat	Tampon JR	JR	Bactéries *St. thermophilus*	Bactéries *St. Bovis*	**Incubation (h)** 0	18h
							N° des tubes	
1. Mesure ZEA fixée en Tp pH4								
- Souche 170	+	-	-	-	+	-	**1-3**	
- Souche *St. Bovis*	+	-	-	-	-	+	**4-6**	
2. Témoin stabilité toxine	+ (50%)	-	+	-	-	-	**7-9**	**10-12**
3. Témoins sans bactéries								
- ZEA	+ (50%)	+	+	+	-	-	**13-15**	**16-18**
- α ZOL	+ (50%)	+	+	+	-	-	**19-21**	**22-24**
4. Témoins sans toxine								
- Souche *St. thermophilus*	-	+	+	+	+	-	**25**	**26**
- Souche *St. Bovis*	-	+	+	+	-	+	**27**	**28**
5. Témoins sans substrat								
- Souche *St. thermophilus*	+	-	+	+	+	-	**29-31**	**32-34**
- Souche *St. Bovis*	+	-	+	+	-	+	**35-37**	**38-40**
6. Essais								
- Souche *St. thermophilus*	+	+	+	+	+	-	**41-43**	**44-46**
- Souche *St. Bovis*	+	+	+	+	-	+	**47-49**	**50-52**

3. Stabilité du complexe *Streptococcus* – zéaralénone dans des conditions simulant l'abomasum et l'intestin

Ces essais sont réalisés avec la souche *Streptococcus thermophilus* RAR1. Le complexe *Streptococcus*-ZEN est incubé séparément dans les conditions de l'abomasum (pepsine ou lysozyme) pendant 1h à 39°C et dans les conditions de l'intestin (pancréatine ou bile bovine) pendant 2h à 39°C. Le complexe est également incubé successivement dans la pepsine* puis dans un mélange de pancréatine + bile bovine. Des contrôles sont réalisés en incubant le complexe dans du tampon pH 4 dans les mêmes conditions pour évaluer l'effet lavage.
A l'issue des incubations, les fractions relarguées et restant liées sont déterminées. Les essais sont réalisés en triple.
* Sans lysozyme car il est inactivé (Dobson *et al* 1984)

3.1 Préparation de la solution de zéaralénone

Un aliquot de SS1-ZEN (SS1-ZEN001–004) est évaporé à sec et repris par 1000 µl de méthanol

Contrôle spectrophotométrique SS1-ZEN
50 µl SS1 + 450 µl méthanol
Puis, 200 µl de cette solution + 800 µl méthanol
DO 274 = 0,994
[SS1-ZEN] = 0,994 x 50 x 22,89 = **1137 µg/ml**

Préparation SS2-ZEN à 100 µg ml-1 dans EOH / eau 1:3.
Dans un tube à hémolyse, **263,9 µl** de SS1-ZEN sont évaporés à sec à 45 °C sous flux d'azote. L'extrait sec est repris dans **750 µl** d'éthanol et l'ensemble est agité au vortex, passé 3 min dans un bain à ultra-sons et à nouveau agité au vortex. **2250 µl d'eau UHQ** sont ajoutés de manière à obtenir **3000 µl** de solution à **100 µg/ml** dans **EOH / eau 1:3**.

Préparation de la solution de ZEN à 5 µg/ml dans le tampon pH 4 (ST/ZEN)
1600 µl SS2-ZEN + **30400 µl** tampon pH 4 (1,25% éthanol dans la solution finale).

3.2 Formation du complexe Streptococcus thermophilus RAR1 – ZEN

- **$1,75 \times 10^{10}$ UFC** sont récupérées et lavées 3 fois :

  * 2 lavages par mise en suspension des bactéries dans 5 ml de PBS 0,01M, pH 7,4, puis centrifugation à 3000g, 10 min, <10°C
  * 1 lavage par ajout de 35 ml de PBS (suspension à 5×10^8 UFC/ml).
- Cette suspension, maintenue en agitation sur un agitateur magnétique, est distribuée en tubes polypropylène diam. 1 cm (**1 ml par tube**)
- Les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min, <10°C) et le surnageant est éliminé avec le système d'aspiration en veillant bien à ne pas éliminer de cellules
- **1 ml** de ST/ ZEN à 5 µg ml^{-1}dans le tampon pH 4 sont ajoutés à **27** culots bactériens
- 3 tubes sont utilisés pour déterminer les fractions de ZEN libres et liées directement après la complexation
- Tous les tubes sont agités au vortex et incubés pendant **1 h à 25°C** sous agitation continue (480 mvts/min)
- Après cette période d'incubation, tous les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min, <10°C) et le surnageant est éliminé

3.3 Mise en suspension du complexe dans les différentes solutions et incubation
Les complexes sont mis en suspension dans **1 ml** de solution d'incubation et incubés selon le tableau ci-dessous.

Incubation complexe	Conditions incubation	Nb tubes	Codes tubes	Analyse surnageant	Analyse culot
Sans incubation	-	3	1-3	3	3
Tampon pH 4	1h à 39°C	6	4-9	3	3
	Puis, 2h à 39°C		7-9	3	3
Tampon pH 4	2h à 39°C	3	10-12	3	3
Solution lysozyme	1h à 39°C - pH 6	3	13-15	3	3
Solution pancréatine	2h à 39°C - pH 7	3	16-18	3	3
Solution bile	2h à 39°C - pH 7	3	19-21	3	3
Solution pepsine	1h à 39°C - pH 2,5	6	22-27	3	3
Solution pancréatine + bile	Puis, 2h à 39°C - pH 7		25-27	3	3
TOTAL		27		27	27

A la fin de la période d'incubation, tous les tubes sont centrifugés à 3000g, 10 min, 5°C. Les fractions de ZEN relarguées (surnageants) et restant liées (culots) sont ensuite déterminées.

4. Stabilité du complexe jus de rumen – zéaralénone dans des conditions simulant l'abomasum et l'intestin
Après formation du complexe JR-ZEN, celui-ci est incubé i) dans une solution de pepsine pendant 1h à 39°C, ii) successivement dans la pepsine pendant 1h à 39°C puis dans un mélange de pancréatine + bile bovine pendant 2h à 39°C. Des contrôles sont réalisés en incubant le complexe dans du tampon pH 4 dans les mêmes conditions pour évaluer l'effet lavage.

4.1 Formation du complexe JR-ZEN
Le complexe JR-ZEN est formé en incubant **5 ml de JR-tampon** (Cf. III-2.3) avec **25 µl** SS1-ZEN (**5 µg/ml final**) dans des tubes de Hungate pendant **1h à 39°C** (**n =15** tubes)

Trois tubes sont utilisés pour déterminer les fractions de ZEN libres et liées directement après la complexation

Après cette période d'incubation, tous les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min, <10°C) et le surnageant est éliminé

4.2 Mise en suspension du complexe JR-ZEN dans les différentes solutions et incubation
Les complexes sont mis en suspension dans **1 ml** de solution d'incubation et incubés selon le tableau ci-dessous.

Incubation complexe	Conditions incubation	Nb tubes	Codes tubes	Analyse surnageant	Analyse culot
Sans incubation	-	3	1-3	3	3
Tampon pH 4	1h à 39°C	6	4-9	3	3
	Puis, 2h à 39°C		7-9	3	3
Solution pepsine	1h à 39°C - pH 2,5	6	10-12	3	3
Solution pancréatine + bile	Puis, 2h à 39°C - pH 7		13-15	3	3
TOTAL		15		15	15

A la fin de la période d'incubation, tous les tubes sont centrifugés à 3000g, 10 min, 5°C. Les fractions de ZEN relarguées (surnageants) et restant liées (culots) sont ensuite déterminées.

5. Analyses

Dosage de la ZEN et des zéaralénols dans les fractions liquides et solides du jus de rumen
Cf. annexe 5.

Dosage de la ZEN et des zéaralénols dans les solutions de pepsine, lysozyme, pancréatine et bile bovine
Tous les surnageants sont dilués au 1/5 ème dans la PM avant injection (40 µl échantillon ajoutés à 160 µl PM dans un vial), puis **20 µl** sont injectés dans la chaîne CLHP.

Dosage de la ZEN et des zéaralénols dans les culots bactériens
500 µl de méthanol sont ajoutés au culot bactérien. L'ensemble est agité au vortex pendant **30 sec** à vitesse maximale, passé 3 min dans un bain à ultra-sons et à nouveau agité au vortex pendant **30 sec**. Transférer dans un tube eppendorf. Le tube est centrifugé à **7000 rpm** pendant **3 min**. **200 µl** de surnageant sont évaporés à sec à 45°C sous flux d'azote. L'extrait sec est repris dans **200 µl de PM** (MeOH – ED 65 : 35), agité au vortex, passer 3 min dans un bain à ultra-sons et agité de nouveau au vortex. **20 µl** sont injectés dans la chaîne CLHP.

Conditions chromatographiques
- Colonne **n°3** (Bischoff, 125 x 4,6 mm ; Prontosil 120-3-C18-H 3.0 µm)
- PM = **MeOH / Ac acétique 1% / ACN 45 : 45 : 10**
- Flux = **1 ml min^{-1}**
- Volume injection = **20 µl**
- Réglage détecteur de fluorescence:
  - λ exc = **274 nm**
  - λem = **440 nm**
  - PMT = **800 V**
- Détection en UV (274 nm)
- Tr ZEN = 24,2 min (Tr pouvant varier selon le pH)
- Tr α-ZOL = 19,9 min
- Tr β-ZOL = 12,1 min

Laboratoire des MYCOTOXINES **URH-DIMA**	**PROTOCOLE**
	Réf: PROT-URH-DIMA/ Interaction bactérie-fumonisines
	Rédigé le 28/02/2006
	Validé le 8/04/2006
OBJET : Mécanisme de séquestration des fusariotoxines par les bactéries fermentaires **- Etude de l'interaction bactérie - fumonisines B_1 et B_2 -**	
Auteur du document : Vincent NIDERKORN	Date et signature
Responsable Qualité	Date et signature
Responsable d'Equipe	Date et signature
DESTINATAIRES ☐ Secrétariat ☐ Technicien(s) ☐ Stagiaire(s) ☑ Responsable(s)	

SOMMAIRE

I- OBJECTIF **2**

II- MATERIELS ET REACTIFS **2**
1. Matériels 2
2. Milieux et réactifs 2
3. Préparation des solutions tampons 3
4. Solutions stock de fusariotoxines 3
5. Matériels biologiques bactériens 3

III- PROTOCOLE **4**
1. Essai de séquestration 4
2. Validation de la conservation des suspensions bactériennes à -18°C 5
3. Détermination des constituants pariétaux bactériens séquestrant les fumonisines 5
   3.1 Essais de séquestration par des parois bactériennes
   3.2 Effet de traitements physico-chimiques des bactéries
   3.3 Effet de traitements enzymatiques des bactéries
   3.4 Effets de mutations affectant la synthèse de certains constituants pariétaux
   3.5 Essais de séquestration par des peptidoglycanes purifiés
4. Détermination des groupements chimiques des fumonisines intéragissant avec les bactéries 8
   4.1 Essais de séquestration des fumonisines dérivatisées
   4.2 Essais de séquestration des fumonisines hydrolysées (aminopentols)
   4.3 Effet de l'addition de sels dans le milieu
5. Dosage des fumonisines et expression des résultats 11

IV- MODELISATION MOLECULAIRE **12**

I- OBJECTIF

L'objectif de ce travail est de caractériser l'interaction aboutissant à la séquestration des fumonisines B_1 et B_2 par les bactéries fermentaires.
Une approche à 2 niveaux est mise en œuvre : i) la détermination des constituants pariétaux bactériens séquestrant les fumonisines, ii) la détermination des groupements chimiques des fumonisines intéragissant avec les bactéries. Dans ce cadre, une méthode de modélisation moléculaire des fumonisines *in silico* est également utilisée.

II- MATERIELS ET REACTIFS

1. Materiels

- Matériels des modes opératoires (MO) suivants :
  - *Culture des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 1)
  - *Conservation des souches de bactéries fermentaires par cryogénisation* (annexe 2)
  - *Méthode turbidimétrique pour l'estimation de la concentration bactérienne des principaux genres de bactéries fermentaires* (annexe 3)
  - *Dosage des fusariotoxines déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines B_1 et B_2 dans l'infusât de maïs acidifié* (annexe 4)
- Matériels du protocole *Elim. fusariotoxines* — Annexe 7
- Bain-marie 100°C — Réf : labo mycotoxines
- French Press — Réf : INRA Theix
- Sonicateur 200W — Réf : Branson 250D
- Sonde sonicateur (volume 10-50 ml) — Réf : Branson
- Bloc chauffant — Réf : STUART SBH130D
- Chaîne HPLC + logiciel acquisition Karat — Réf : Beckman
- Fluorimètre FL3000 — Réf : Thermo- Finnigan
- Colonne HPLC n°15 Prontosil, 125x4.6, 3 µm — Réf : Bishoff

2. Milieux et réactifs

- Milieux de culture des bactéries fermentaires (Cf. annexe 1)
- Infusât de maïs acidifié (Cf. annexe 4)
- Réactifs relatifs au dosage des fumonisines dans l'infusât de maïs acidifié (Cf. annexe 4)
- Fumonisine B_1 — Réf: SIGMA F1147
- Fumonisine B_2 — Réf: Promochem
- KOH — Réf: RP Normapur 26.668.263
- Tris-HCl pH 8 — Réf: Laboratoire fermentations
- Di-potassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4) — Réf: PROLABO 180.026931.54
- Di-sodium hydrogénophosphate (Na_2HPO_4) — Réf: RP Normapur 28 027.262
- Di-sodium tétraborate ($Na_2B_4O_7$, 10 H_2O) — Réf: RP Normapur 27 727.297
- *o*-phtaldialdéhyde (OPA) — Réf: SIGMA P-1378
- 2-mercaptoethanol — Réf: SIGMA M-6250

Réactifs traitements chimiques

- HCl 37% — Réf: Normapur 20 252.290
- NaOH — Réf: Rectapur 28 245.298
- Acide trichloracétique (TCA) — Réf: SIGMA T9159
- Sodium Dodécyle sulphate (SDS) — Réf: Rectapur 27 926.238

Enzymes

- Lysozyme — Réf: SIGMA 62970
- Mutanolysine — Réf: SIGMA M9901
- Pronase E — Réf: SIGMA P0652
- Lipase — Réf: SIGMA L8906
- N-glycosidase — Réf: Roche Diagnostics 11365193001
- Trypsine — Réf : SIGMA T1426

Sels

- NaCl — Réf: Normapur 27 810.295
- $CaCl_2$ — Réf: Rectapur 28 876.298

3. Préparation des solutions tampons

- Tampon de lavage des cellules bactériennes (PBS 0,01 M, **pH 7,4**)
  Cf. Protocole *Criblage souches*

- Tampon phosphate pH 6
  Cf. protocole *Elim. fusariotoxines*

- Tampon Tris-HCl pH 8, 10 mM $CaCl_2$
  Pour 100 ml :

$CaCl_2$	0,111 g
Tris-HCl, pH 8	qsp 100 ml

- Tampon 0,1 M phosphate, 1% 2-mercaptoéthanol, 12,5mM EDTA, pH 7,1
  Pour 100 ml :

K_2HPO_4	0,952 g
Na_2HPO_4	0,425 g
EDTA	0,465 g
2-mercaptoethanol	1 ml
Eau UHQ	qsp 100 ml

- Tampon borate pH 10 ($Na_2B_4O_7$, 10 H_2O 0,1M)
  Pour 100 ml :

$Na_2B_4O_7$, 10 H_2O	3,8 g
Eau UHQ	qsp 100 ml

Le pH des solutions tampon est vérifié après leur préparation et avant leur utilisation.

4. Solutions stock de fusariotoxines

Reconstitution solutions stocks FB_1 (Sigma Aldrich, lot 033K4035) et FB_2 (Promochem, Batch B/00) avec un volume précis de mélange ACN/eau (1/1) (pas de scan possible)

[SS1/FB_1] = 1 mg/ml : 5 mg FB_1 + 5 ml ACN/eau (1/1) par pesée
[SS1/FB_2] = 3 mg/ml : 12,4 mg FB_2 + 4133 µl ACN/eau (1/1) par pesée

*Préparation solution stock à **400 µg/ml** (**SS2/FB_1 et SS2/FB_2**)*
SS2/FB_1: 1200 µl SS1/FB_1 + 1800 µl ACN/eau (1/1)
SS2/FB_2: 400 µl SS1/FB2 + 2600 µl ACN/eau (1:1)

5. Matériels biologiques bactériens

5.1 Souches bactériennes

Deux souches, ayant montré des taux de séquestration des fumonisines assez différents lors du criblage de souches (*Streptococcus* > *Lactobacillus*), ont été sélectionnées pour cette étude :

- *Lactobacillus paraplantarum* CST 10961 = CNRZ 1885 (origine : CNRS - FRE2326)
- *Streptococcus thermophilus* RAR-1 (origine : LGMPA, INRA JOUY-EN-JOSAS)

5.2 Mutants et souches sauvages parentes

- *Streptococcus thermophilus* JIM 8752 = mutant exopolysaccharides (EPS) (-) de la souche sauvage CNRZ 1066 (origine : INRA Génétique microbienne JOUY-EN-JOSAS). Ce mutant ne sécrète pas d'EPS dans le milieu de culture et est dépourvu d'EPS capsulaire dans les conditions de culture utilisées (Pierre Renault, INRA JOUY-EN-JOSAS)
- *Streptococcus thermophilus* CNRZ 1066 (origine : INRA Génétique microbienne JOUY-EN-JOSAS)
- Mutants de la souche *Lactococcus lactis spp cremoris* MG1363 (origine : INRA UR888 Génétique des bactéries immobilisées, JOUY-EN-JOSAS)

Coll N°	Genotype	Fonction	Référence
1863	MG1363	Type sauvage	Ibrahim et al. 2004
1562	ΔacmA	AcmA = PG hydrolase (activité N-acetyl-glucosamidase) (cassures PG qui augmente les propriétés adhésives et diminue la taille des chainettes) Peut aussi agir sur les chaines de *Streptococcus*	Ibrahim et al. 2004 Mercier et al. 1999
2065	dacB -	PG décarboxylase	
3787	Xyn D surexprimé	PG déacétylase	
3910	Lysozyme-résistant	Modifications dans l'acétylation du PG	
4075	MG1363 / p3916	Contrôle pour les souches 3910 et 3787	
4289	Yvh B -	PG déacétylase	
4534	Xyn D -	PG déacétylase	
1870	PrtP +	Proteinase de paroi (ancrée) Initie la dégradation protéolytique des caséines du lait Confère aux *Lactococci* des propriétés physi-chimiques de surface qui augmentent leur pouvoir adhérent sur des surfaces hydrophobes	Ibrahim et al. 2004
1842	ponA -	ponA code la PBP* 1A (synthèse PG) La mutation dérègle la machinerie de synthèse du PG et augmente l'adhésion	 Ibrahim et al. 2004 Mercier et al. 2002
2054	pbp 1B -	Code la PBP 1B	
2092	pbp 2A -	Code la PBP 2A	
2081	pbp 2B -	Code la PBP 2B	
1850	37 + CPS	Production de polysaccharide capsulaire type 37	Llull et al. 2005
4202	D et D -	Synthèse déficiente d'acide lipotéichoique	
4240		PG de *Pneumococcus*	

Toutes les souches sont des mutants de *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363
PG = peptidoglycane
PBP (Penicillin binding protein): Groupe d'enzymes (transglycosylase et transpeptidase) catalysant la liaison de polymères au PG (Matsuhashi, 1994; Mercier et al. 2002)

5.3 Peptidoglycanes

- Peptidoglycane purifié de *Micrococcus luteus* Réf: SIGMA 52243
  Certificat analyse Fluka (lot 064619/1) : C : 47,20% ; H : 7,11% ; N : 9,20%

- Peptidoglycane purifié de *Bacillus subtilis* Réf: SIGMA 69554
  Certificat analyse Fluka (lot 017067/1) : C : 50,20% ; H : 7,82% ; N : 13,74%

III- PROTOCOLE

1. Essai de séquestration

1.1 Culture, récupération, estimation de la concentration bactérienne et lavage des bactéries
Cf protocole *Elim. fusariotoxines* (annexe 7).

1.2 Préparation de l'infusat de maïs acidifié + fumonisines
Solution de contamination ST/FB contamination (**100 µg FB_1 + 100 µg FB_2 /ml ;** ACN final = **2%**)
Pour 1 ml (préparer la veille de l'expérimentation):

- Dans un tube à hémolyse propre et neuf, évaporation à sec (45°C) de 100 µl SS1/FB_1 et 33,33 µl SS1/FB_2 sous courant d'azote
- Reprise dans 20 µl acétonitrile (ACN)
- Agitation au vortex, passage dans un bain à ultra-sons pendant 3 min, agitation au vortex.
- Ajout de 980 µl d'eau UHQ
- Agitation au vortex, passage dans un bain à ultra-sons pendant 3 min, agitation au vortex.
- Conservation à 4°C

Infusât de maïs acidifié + fumonisines (**5 µg FB_1 + 5 µg FB_2 /ml** ; ACN final = **0,1%**)
Pour 10 ml : 500 µl ST/FB + 9500 µl infusât de maïs acidifié

1.3 Déroulement de l'essai de séquestration

- Mise en suspension du matériel biologique bactérien à tester (cellules bactériennes fraîches ou décongelées, traitées ou non, parois, peptidoglycanes) dans **1 ml** d'infusât de maïs acidifié contenant les fumonisines
- Des témoins positifs (sans matériel bactérien) et négatifs (sans fumonisine) sont systématiquement réalisés
- Incubation des tubes pendant **1h** à **25°C** sous agitation à **480 mvts/min.**
- A l'issue de la période d'incubation, tous les tubes sont centrifugés (3000g, 10 min., 4°C)
- Les fractions de FB_1 et FB_2 libres (dans le surnageant) et séquestrées (dans le culot après extraction) sont déterminées
- Les essais et les témoins positifs sont réalisés **en triple**

2. Validation de la conservation des suspensions bactériennes à -18°C

Afin de disposer d'un stock homogène de cellules bactériennes de *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885 et *Streptococcus thermophilus* RAR-1, la congélation comme moyen de conservation des bactéries est validée. Il est, en particulier, vérifier que le taux de séquestration de la FB_1 et de la FB_2 n'est pas négativement affecté par ce mode de conservation.

Pour chacune de ces 2 souches :

- Préparation de suspensions bactériennes (lavées) à **5 x 10^9 UFC/ml** dans du PBS
- Congélation à **-18°C** dans des tubes PP bouchés contenant 2 ml de suspension bactérienne (10^{10} UFC/tube)
- 4 ml de suspension (2×10^{10} UFC) sont conservés dans un tube falcon 50 ml pour l'essai de séquestration avec cellules fraîches
- L'essai de séquestration est réalisé sur les cellules fraîches (jour **J**) et après décongélation à température ambiante des bactéries conservées (**J+3**). Pour chaque essai, **10^9 UFC** sont mises en suspension dans **1 ml** d'infusât de maïs + fumonisines.

3. Détermination des constituants pariétaux bactériens séquestrant les fumonisines

3.1 Essais de séquestration par des parois bactériennes

Ces essais sont réalisés sur chacune des 2 souches *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885 et *Streptococcus thermophilus* RAR-1.

Lyse mécanique des cellules bactériennes

- 10 ml d'une suspension à 10^{10} UFC lavées/ ml de PBS préalablement refroidi à 4°C sont soumis à une homogénéisation à haute pression (**12 tonnes/cm²**, French Press fabriquée à l'INRA Theix) suivi d'une sonication (Branson 250D, **18 pulses d'1 sec.** séparés d'**1 sec**).
- La lyse est vérifiée au microscope optique sous immersion.
- Les parois sont lavées 2 fois par ajout de 10 ml de PBS et centrifugation à 10000g, 10 min., 4°C.

Essais de séquestration

Les bactéries intactes et les parois son testées dans les mêmes conditions à une concentration correspondant à 10^{10} UFC/ml.

3.2 Effet de traitements physico-chimiques des bactéries

Ces essais sont réalisés sur chacune des 2 souches *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885 et *Streptococcus thermophilus* RAR-1.

Traitements physico-chimiques

- Décongélation des bactéries à température du laboratoire (tubes avec 2 ml de suspension à 5×10^9 UFC/ml)
- Homogénéisation de la suspension au vortex
- Centrifugation (3000g, 10 min., 4°C) de 1,6 ml de suspension
- Ajout de **4 ml** de chacune des solutions suivantes, agitation au vortex et traitement thermique (bain-marie à 100°C, 15 min.)

Traitements physico-chimiques	Cible	Effet sur cible
Eau UHQ, 25°C, 15 min.	Contrôle	
Eau UHQ, 100°C, 15 min.	Contrôle	
HCl 1N, 100°C, 15 min.	Glucides	Hydrolyse
NaOH 1N, 100°C, 15 min.	Protéines	Extraction / dénaturation
SDS 2% w/v, 100°C, 15 min.	Protéines	Extraction / dénaturation
TCA 10% w/v, 100°C, 15 min.	Glucides / Protéines / Acides téichoiques	Extraction

Référence: Sreekumar et Hosono, 1998

- Refroidissement immédiat pendant 3 min. dans l'eau froide
- Centrifugation 3000g, 10 min., 4°C
- Le culot est lavé 2 fois avec 4 ml eau distillée
- Après le 2ème lavage, **4 ml** d'eau distillée sont ajoutés au culot (suspension à 5×10^9 UFC/ml)
- Distribution de **500 µl/tube** (10^9 UFC traitées/tube) et centrifugation

Essais de séquestration
Les bactéries traitées et non traitées sont testées dans les mêmes conditions (**10^9 UFC/ml**).

3.3 Effet de traitements enzymatiques des bactéries
Ces essais sont réalisés sur chacune des 2 souches *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885 et *Streptococcus thermophilus* RAR-1.

Préparation des solutions enzymatiques
Les préparations enzymatiques, détaillées dans le tableau ci-dessous, sont réalisées le jour de l'expérimentation.

Traitements enzymatiques	Tampon d'incubation	Cible	Effet sur cible
Lysozyme (45000U/ml) [1]	Tampon phosphate pH 6	Peptidoglycane	Hydrolyse liaison NAG β 1-4 NAM
Mutanolysine (5000U/ml) [1]	Tampon phosphate pH 6	Peptidoglycane	Hydrolyse NAM β 1-4 NAG
Lipase (1 mg/ml) [2]	PBS 0,01M, pH 7,4	Acides lipotéichoïques	Hydrolyse
Pronase E (1 mg/ml) [2]	PBS 0,01M, pH 7,4	Protéines	Protéase particulièrement peu spécifique
Trypsine (1 mg/ml) [3]	Tris-HCl pH 8, 10 mM $CaCl_2$	Protéines	AA chargés + (rupture Arg/Lys-X)
N-glycoprotéinase F (60U/ml) [3]	50mM phosphate, 12,5mM EDTA, 1% 2-mercaptoéthanol, , pH 7,1	Glycoprotéines	Rupture liaison protéine - oligosaccharides (Asparagine - Glycanes N-liés)

NAG: N-acétylglucosamine; NAM: acide N-acétylmuramique
Références: [1] Sreekumar et Hosono 1998; [2] Haskard et al. 2000; [3] Lahtinen et al. 2004

Traitements enzymatiques
- Décongélation des bactéries à température du laboratoire
- Homogénéisation de la suspension au vortex
- Centrifugation (3000g, 10 min., 4°C) de 1,6 ml de suspension (8 x 10^9 UFC)
- Ajout de **2 ml** de solution enzymatique (**1 ml** pour la N-glycosidase F), agitation au vortex
- Les suspensions sont incubées pendant **2h** (**24h** pour le traitement à la N-glycosidase F, recommandations fabricant) à **37°C** sous agitation continue à **240 mvts/min**.
- A la fin de la période d'incubation, les suspensions sont centrifugées (12000g, 10 min., 4°C)
- Le culot est lavé 2 fois avec 4 ml eau distillée
- Après le 2ème lavage, **4 ml** de PBS sont ajoutés au culot (suspension à 5×10^9 UFC/ml)
- Distribution de **500 µl/tube** (10^9 UFC traitées/tube) et centrifugation

Essais de séquestration
Les bactéries traitées et non traitées sont testées dans les mêmes conditions (**10^9 UFC/ml**).

3.4 Effets de mutations affectant la synthèse de certains constituants pariétaux
Des essais sont réalisés pour comparer le taux de séquestration

- Du mutant EPS (-) *Streptococcus thermophilus* JIM 8752 et de la souche sauvage de la souche sauvage CNRZ 1066.
  La concentration bactérienne utilisée est de **10^9 UFC/ml**.
- Des mutants de la souche *Lactococcus lactis spp cremoris* MG1363 et de la souche sauvage.

Sur les recommandations du laboratoire nous ayant prêté ces souches, celles-ci sont cultivées en milieu M17 + 0,5% glucose et incubées à 30°C pendant 24h En l'absence de données sur la capacité de séquestration de ces souches, une concentration bactérienne utilisée de **10^{10} UFC/ml** est utilisée pour augmenter la sensibilité de la comparaison.

3.5 Essais de séquestration par des peptidoglycanes purifiés

En l'absence de PG purifié de bactérie lactique ou propionique commercial disponible, les PG de 2 bactéries **gram positives** (*Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*) sont utilisés.

Choix d'une concentration de PG pour le 1er essai de séquestration

- Le PG représente 30 à 70% du poids total de la paroi des bactéries gram + (Schleifer et Kandler 1992) et la paroi constitue environ 20% du poids sec d'une cellule de bactérie gram + (http://www.biodeug.com/cours/microbio01.php)
  Le poids d'une cellule bactérienne est estimé à 10^{-11} g et 70% d'eau soit 3×10^{-12} g (poids sec).

- En partant d'une quantité de PG correspondant à une concentration bactérienne de 10^9 UFC/ml et en considérant une proportion médiane de 50% du poids de la paroi, une concentration de PG théorique pouvant séquestrer significativement fumonisines est grossièrement égale à :
  $0,5 \times 0,2 \times (3 \times 10^{-12}) \times 10^9 = \mathbf{3 \times 10^{-4}}$ **g/ml**

Essai préliminaire

Un 1er essai est réalisé avec un des deux PG en testant une concentration importante (**2,5 mg/ml** >> valeur théorique) pour tester la capacité réelle du PG à séquestrer les fumonisines

L'essai de séquestration est réalisé dans les conditions habituelles à l'exception du volume réactionnel réduit à 200 µl (coût PG) et de la centrifugation en fin de période d'incubation (12000g, 10 min., 4°C) (Shi et al. 2004).

- Pesée de **0,5 mg** PG de *Micrococcus luteus* dans un microtube de 1,5 ml
- Ajout de **200 µl** infusât de maïs acidifié contaminé ([PG] = 2,5 mg/ml.
- Les témoins culots correspondent à 0,5 mg PG dans un microtube 1,5 ml auquel sont ajoutés **10 µl** ST/FB (ajout de **190 µl** ACN/ED 1 :1 pour l'extraction)
- Les culots à analyser sont extraits avec **200 µl** ACN/ED 1 :1

Etablissement des courbes FB_1 et FB_2 séquestrées (%) = f (PG)

Ces courbes sont déterminées pour chacun des 2 PG disponibles dans une échelle de cncentration allant de 0 à 2 mg/ml. Chaque point est réalisé en duplicate

Pour chacun des deux PG :

- Préparation d'une suspension mère de PG (**20 mg/ml** dans l'eau UHQ)
  Ajout de **250 µl** d'eau UHQ à **5 mg** de PG dans un microtube de 1,5 ml
  Bien vortexer, la suspension est homogène

- Préparation des solutions filles de PG

solution PG	SP0	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5
[PG] SP (mg/ml)	**0**	**1**	**5**	**10**	**15**	**20**
PG mère (20 mg/ml) (µl)	0	2,5	12,5	25	37,5	50
Eau UHQ (µl)	100	47,5	37,5	25	12,5	0

- Gamme d'essais

[PG] final	0	0,1	0,5	1	1,5	2
sol. PG	**SP0**	**SP1**	**SP2**	**SP3**	**SP4**	**SP5**
SP (µl)	20	20	20	20	20	20
Infusât + FB	180	180	180	180	180	180

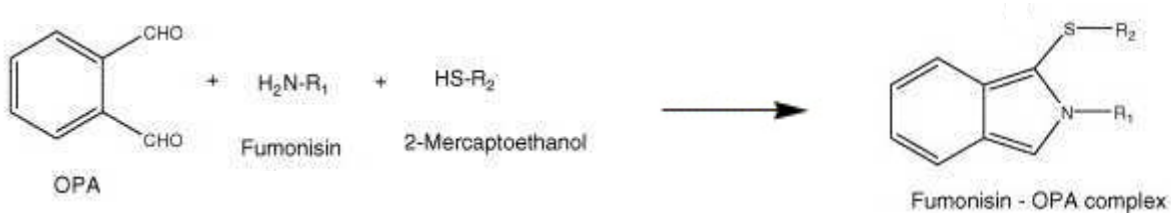
- Les essais de séquestration sont menés dans les mêmes conditions que l'essai préliminaire. Les culots ne sont pas analysés pour ces essais.

4. Détermination des groupements chimiques des fumonisines interagissant avec les bactéries

Les essais suivants sont menés avec les souches *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ 1885 et *Streptococcus thermophilus* RAR-1.

4.1 Essais de séquestration des fumonisines dérivatisées

L'objectif de cette partie est de déterminer si la fonction amine des fumonisines est impliquée dans le mécanisme de séquestration par les bactéries fermentaires. Pour cela, les taux de séquestration de la FB_1 et de la FB_2 sont comparés avec ceux de ces mêmes molécules préalablement dérivatisées c'est-à-dire dont **la fonction amine est masquée** par liaison à de l'OPA.



4.1.1 Essais préliminaires

Le complexe formé entres les fumonisines et l'OPA est **instable** dans le temps et cette instabilité augmente avec la température (Williams et al. 2004). Les essais de séquestration doivent donc être réalisés en **conditions parfaitement contrôlées**, en particulier au niveau du minutage des différentes opérations.

L'objectif de ces essais préliminaires est d'optimiser les conditions d'incubation (durée et température d'incubation, concentration de fumonisines) afin de réaliser les dosages des fumonisines préalablement dérivatisées avec une bonne sensibilité tout en maintenant des taux de séquestration significatifs de fumonisines non dérivatisées.

Effet de la température et du temps d'incubation sur la séquestration des fumonisines B_1 et B_2

Afin de réduire au maximum la dissociation du complexe fumonisine-OPA entre la mise en incubation avec les bactéries et l'analyse chromatographique, la durée d'incubation et la température doivent être réduits mais en conservant des taux de séquestration des fumonisines suffisants.

Des essais de séquestration sont réalisés à **2 températures d'incubation (4°C et 25°C)**, chacune à **5 durées d'incubation (0 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 min.)**.

Ces essais sont menés avec la souche *Streptococcus thermophilus* RAR1 décongelée à une concentration bactérienne de **10^9 UFC/ml**. Chaque mode d'incubation (n=10) est réalisé en duplicate avec 2 témoins positifs (n= 40 tubes). Après incubation et centrifugation, la FB_1 et la FB_2 sont dosées dans le surnageant.

Cinétique de dissociation des complexes FB_1-OPA et FB_2-OPA

Cette cinétique est menée **en solution pure** à **2 températures d'incubation (4°C et 25°C)**.

- La veille de l'essai, placer environ 5 ml de tampon borate et 5 ml de réactif de dérivatisation dans un réfrigérateur à 4°C. Conserver des volumes équivalents de ces réactifs à 25°C.

Pour chaque température testée :

- Dans un tube à hémolyse couvert de papier d'aluminium (sensibilité OPA à la lumière), mélanger **1800 µl** tampon borate pH 10 + **200 µl** solution FB_1 + FB_2 (**5 µg/ml** chacune) dans un mélange ACN-eau 1 :1
- A T = 0, ajouter 2000 µl de réactif de dérivatisation et agiter au vortex
- A **T= 2, 20; 40; 60 ; 80; 120 min.**, **20 µl** sont injectés directement dans la chaîne HPLC (sans prep.) Les temps correspondent au « start run ». Le vial est préparé juste avant l'injection

4.1.2 Paramètres optimisés pour les essais de séquestration de fumonisines dérivatisées

Les conditions suivantes apparaissent comme un bon compromis niveau de séquestration / sensibilité et permettent les essais dans des conditions satisfaisantes.

Paramètre	Valeur retenue
% ACN	0,5% final
[FB]	20 µg/ ml final
pH infusât	pH 4,8
[bact]	10^{10} ufc/ml
Temps binding	9 mn 15 esc
Température binding	25°C
Temps et vitesse centrifugation	7000 rpm, 3 mn
Température centrifugation	4°C

4.1.3 Déroulement des essais

Des essais de séquestration de la FB_1, de la FB_2 et des complexes FB_1-OPA et FB_2-OPA sont réalisés l'un après l'autre dans des conditions rigoureusement identiques :

- Tous les milieux et réactifs sont utilisés à une température de 25°C
- *Préparation des solutions de contamination* (**SC/FB_1** et **SC/FB_2**) (**800 µg/ml**, ACN = **20%**)
  480 µl SS1/FB_1 (ou **160 µl** SS1/FB_2) sont déposés dans un tube à hémolyse et évaporés à 45°C sous flux d'azote. L'extrait sec est repris par 120 µL d'ACN, agité au vortex, passés 3 min. dans un bain à ultra-sons et à nouveau agité au vortex. Ensuite, **480 µl** d'eau UHQ sont ajoutés et l'ensemble est homogénéisé de la même façon.

- *Préparation des réactifs de dérivatisation avec et sans OPA*

	RD	RD sans OPA
OPA (mg)	80	0
Méthanol (ml)	2	2
Tampon borate, pH 10 (ml)	10	10
2-mercaptoéthanol (ml)	0,1	0,1

- A **T = 0**, mélanger **40 µl** de RD (avec ou sans OPA) à **40 µl** de SC/FB_1 (ou SC FB_2) dans un tube à hémolyse, selon le tableau ci-dessous :

	FB_1	FB_2	FB_1-OPA	FB_2-OPA
SC/FB_1	40	0	40	0
SC/FB_2	0	40	0	40
RD	0	0	40	40
RD sans OPA	40	40	0	0

  Pendant le temps de réaction, déposer 950 µl d'infusât acidifié à pH 4 dans un tube en polypropylène contenant des bactéries (essais : **10^{10} ufc/ml** décongelées et centrifugées) ou sans bactéries (témoins sans bactérie). Bien homogénéiser au vortex.
- **T = 2 mn** : ajouter **50 µl** de solution préparée à T = 0. Agiter au vortex max pendant 5 sec., 1 sec arrêt, puis à nouveau 5sec.
- **T = 2 mn 30 sec. :** Mise en incubation (séquestration) pendant 9 mn 15 sec à 25°C, agitation 480 mvts/min.
- **T = 11 mn 45 sec** : arrêt de l'agitation
- **T = 12 mn** centrifugation (7000 rpm, 3 mn, 4°C, centrifugeuse Jouan, frein ON).
  Rq : Maintenir la centrifugeuse à 4°C tout au long de l'expérimentation. La centrifugation (avec montée et descente à 7000 rpm) dure 7 mn 30 sec.
- **T = 20 mn**:
  - Cas des complexes FB-OPA: **10 µl** surnageant + **190 µl** tampon borate, pH 10 dans un vial conique. Agiter au vortex
  - Cas des FB: dilution au 1/4 du surnageant dans un microtube (50 µl surnageant + 150 µl ACN :ED 1 :1), puis 10 µl + 90 µl tampon borate, pH 10 dans un vial à fond plat (prep.)
- **T = 21 mn** :

- Cas des complexes FB-OPA: injection directe sans dérivatisation
- Cas des FB: dérivatisation avant injection

Tous les essais et les témoins sont réalisés en duplicate ou en triple (si un écart de résultat est observé).

4.2 Essais de séquestration des fumonisines hydrolysées (aminopentols)

4.2.1. Préparation des solutions de fumonisines hydrolysées et non hydrolysées

Hydrolyse des fumonisines (Pagliuca et al. 2005, Niderkorn et al. 2006)

- **50 µl** SS1/FB_1 (**16,67 µl** de SS1/FB_2) sont évaporés à sec à 45°C sous flux d'azote dans 7 vials en verre ambré (17 vials pour la FB_2)
- **500 µl** de méthanol sont ajoutés dans chaque vial. Les vials sont agités au vortex, passés dans un bain à ultra-sons pendant 3 mn, puis à nouveau agités au vortex
- **500 µl** de KOH 1N (56,11 g KOH/l) sont ajoutés dans chaque vial. Agiter au vortex
- Les vials bouchés sont chauffés à **70°C pendant 1h** dans un bloc chauffant, puis laissés à refroidir à température ambiante.

Préparation des solutions de contamination ST/AP_1 et ST/AP_2 (et blancs)

- Dans un tube à hémolyse, **6,4 ml** de solution de AP_1 (ou **16 ml** de solution de AP_2) sont évaporés à sec à 45°C (1 ml par 1 ml pour limiter la hauteur de liquide)
- Des blancs sont réalisés en évaporant dans les mêmes conditions **6,4 ml** (blanc AP_1) et **16 ml** (blanc AP_2) d'un mélange Méthanol/KOH 1N 1:1 v/v
- Tous les extraits secs sont repris par **48 µl** ACN, agités au vortex, passés dans un bain à ultra-sons pendant 3 mn, puis à nouveau agités au vortex
- **752 µl** eau UHQ sont ajoutés dans chaque tube à hémolyse. L'ensemble est homogénéisé de la même façon
- Des dosages de contrôle sont réalisés pour vérifier que la FB_1 et la FB_2 ont bien été complètement hydrolysées en AP_1 et AP_2 , respectivement.

Préparation des solutions de contamination ST/FB_1 et ST/FB_2

- **200 µl** de SS1/FB_1 (**66,67 µl** de SS1/FB_2) sont évaporés à sec à 45°C sous flux d'azote dans des tubes à hémolyse. Les extraits secs sont repris par **80 µl** ACN et homogénéisés comme précédemment.
- **320 µl** eau UHQ sont ajoutés

Dans ces conditions, le pourcentage d'ACN est équivalent dans tous les essais.

Préparation des solutions de FB_1, FB_2, AP_1 et AP_2 dans l'infusât acidifié pH4

	FB_1	FB_2	AP_1	AP_2
ST/FB_1 (µl)	100	0	0	0
ST/FB_2 (µl)	0	100	0	0
ST/AP_1 (µl)	0	0	500	0
ST/AP_2 (µl)	0	0	0	500
Blanc/AP_1 (µl)	500	0	0	0
Blanc/AP_2 (µl)	0	500	0	0
ACN 20% (µl)	0	0	100	100
Infusât de maïs acidifié (µl)	9400	9400	9400	9400

% ACN final = 0,5%

Comme une quantité importante de KOH est présente dans le milieu, entraînant un pH basique, le pH du milieu est **ajusté à pH 4** avec HCl 6N. Cette réacidification n'affecte pas le dosage.

4.2.2 Essais de séquestration

Ces essais sont menés à une concentration bactérienne de **10^{10} UFC/ml**. Après incubation et centrifugation, la FB_1, la FB_2, l'AP_1 et l'AP_2 sont dosées dans le surnageant et le culot bactérien.

4.3 Effet de l'addition de sels dans le milieu

La structure chimique des fumonisines est comparable à celle de l'EDTA (tétraacide). Cette structure est favorable à la complexation des cations au niveau des bras d'acide tricarboxyliques. L'observation d'une diminution du taux de séquestration des fumonisines en présence de cations pourrait signifier une compétition à de même sites de fixation.

Des essais de séquestration sont réalisés en présence de **0 ; 0,1 et 0,5 M de NaCl ou $CaCl_2$**.

Préparation des solutions d'infusât de maïs + ions

Dans des fioles jaugées de 10 ml :

	Infusât + $CaCl_2$			Infusât + NaCl		
[$CaCl_2$] ou [NaCl] (M)	0	0,1	0,5	0	0,1	0,5
$CaCl_2$ (g)	0	0,111	0,555	-	-	-
NaCl (g)	-	-	-	0	0,0584	0,2922
Infusât acidifié	qsp 10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml	qsp 10 ml
pH	3,97	3,74	3,69	3,97	4,06	3,9

Essais de séquestration
Les essais de séquestration sont réalisés avec **10^9 UFC/ml**. Les fumonisines sont dosées dans le surnageant et le culot bactérien.

5. Dosage des fumonisines et expression des résultats

5.1 Essai de séquestration

Analyse du surnageant (fraction libre)

- Dans un microtube de 1,5 ml, **dilution au ¼**: 40 µl surnageant + 120 µl ACN/ED 1 :1
- Dans vial 500 µl à fond plat (prep) : 60 µl tampon borate pH10 + 40 µl surnageant dilué (+ 100 µl OPA)
- Injection **20 µl** dans le HPLC après 2 min. de temps de réaction (dérivatisation)

Fraction libre (%) = 100 × (Aire de pic surnageant essai / Aire de pic surnageant témoin sans bactéries)

Analyse du culot bactérien (fraction liée)

- Préparation des témoins culots
  - Ajout de **50 µl** ACN/ED 1 :1 au culot bactérien et agitation au vortex
  - Ajout de **50 µl ST/FB** sur le culot (5 µg FB_1 + 5 µg FB_2), agitation au vortex

- Extraction et analyse
  Les témoins culots et les culots à anlysés sont traités de la même façon.
  - Ajout de **1000 µl** ACN/ED 1 :1 aux culots à analyser (**900 µl** pour les témoins)
  - Agitation au vortex (max) 2 fois 10 sec.
  - Passage 6 min dans un bain à ultra-sons
  - Agitation au vortex (max) 10 sec.
  - Centrifugation 7000 rpm, 3 min.
  - Dans un microtube 1,5 ml, **dilution au ¼**: 40 µl surnageant + 120 µl ACN/ED 1 :1
  - Dans vial 500 µl à fond plat (prep) : **60 µl** tampon borate pH10 + **40 µl** surnageant dilué (+ 100 µl OPA)
  - Injection **20 µl** dans le HPLC après 2 min. de temps de réaction (dérivatisation)

  Fraction liée (%) = 100 × (Aire de pic culot essai / Aire de pic témoin culot)

- Rendements d'extraction
  Ces rendements sont calculés avec chacune des 2 souches testées et pour chacune des 2 fumonisines
  Des culots ont été contaminés dans les mêmes conditions que les témoins culot avec i) une solution à 80 µg/ml FB et ii) une solution à 10 µg/ml FB, correspondant à des taux de séquestration de 80% et 10%, respectivement.

  Rdt (%) = 100 × (Aire de pic culot contaminé / Aire de pic solution standard à la même concentration de FB)

5.2 Conditions chromatographiques

- Chaine Beckman
- Colonne n°15
- Methode *Fumofluoseul.met* (gradient)
- Phase mobile : (A) Methanol-ED 50:50 acidifié à pH 3,35 avec acide acétique pur

(B) Acétonitrile
- Mélange automatique échantillon + OPA, 2 mn de temps de réaction (dérivatisation)
- Volume injecté = 20 µl
- PMT = 800V

Dans ces conditions, les temps de rétention des fumonisines B_1 et B_2 et des aminopentols AP_1 et AP_2 sont de **9,9 ; 12,2 ; 10,2 ; 13,4 min.**, respectivement.

Pour le gradient appliqué, se référer à l'annexe 4.

IV- MODELISATION MOLECULAIRE

RECOMMANDATION DE LA COMMISSION

du 17 août 2006

concernant la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des toxines T-2 et HT-2 et de fumonisines dans les produits destinés à l'alimentation animale

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(2006/576/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne, et notamment son article 211, deuxième tiret,

considérant ce qui suit:

(1) À la demande de la Commission, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a émis des avis sur les mycotoxines déoxynivalénol (2 juin 2004) ([1]), zéaralénone (28 juillet 2004) ([2]), ochratoxine A (22 septembre 2004) ([3]) et fumonisines (22 juin 2005) ([4]).

(2) Ces avis concluent que les quatre mycotoxines considérées ont toutes des effets toxiques sur plusieurs espèces animales. Le déoxynivalénol, la zéaralénone et les fumonisines B1 et B2 ne sont transférées que de manière très limitée de l'alimentation animale à la viande, au lait et aux œufs, et la contribution de la nourriture d'origine animale à l'exposition totale de l'homme à ces toxines est donc insignifiante. L'ochratoxine A peut être transférée des aliments pour animaux aux denrées d'origine animale, mais l'évaluation de l'exposition indique que ces dernières ne contribuent que dans une faible mesure à l'exposition alimentaire de l'homme à l'ochratoxine A.

(3) Les données sur la présence des toxines T-2 et HT-2 dans les produits destinés à l'alimentation animale sont encore très limitées. Certains éléments indiquent toutefois que la présence des toxines T-2 et HT-2 dans les produits destinés à l'alimentation des animaux pourrait être préoccupante. Par conséquent, il est nécessaire de mettre au point et de valider une méthode d'analyse sensible, de collecter davantage de données sur la présence de ces substances et de poursuivre l'étude des facteurs responsables de la présence des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits à base de céréales, en particulier dans l'avoine et les produits à base d'avoine.

(4) Compte tenu des conclusions des avis scientifiques cités au considérant 1, du manque de données fiables sur les toxines T-2 et HT-2 et des variations importantes de leur présence d'une année à l'autre, il convient de recueillir davantage de données sur l'existence de ces mycotoxines dans les divers aliments pour animaux et les matières premières entrant dans leur composition, en plus de celles déjà fournies par les programmes de contrôle coordonnés pour 2002 ([5]), 2004 ([6]) et 2005 ([7]).

(5) Afin de fournir aux États membres des orientations sur l'acceptabilité des céréales, des produits à base de céréales et des aliments composés destinés à l'alimentation des animaux, et d'éviter des différences entre les valeurs acceptées par les différents États membres, qui peuvent entraîner une distorsion de la concurrence, il y a lieu de recommander des valeurs de référence.

(6) Les États membres ne seraient tenus d'appliquer les valeurs de référence pour les fumonisines B1 et B2 qu'à partir du 1er octobre 2007, conformément aux règles établies par le règlement (CE) nº 856/2005 de la Commission du 6 juin 2005 modifiant le règlement (CE) nº 466/2001 en ce qui concerne les toxines du *Fusarium* ([8]).

([1]) Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM), de l'EFSA, à la suite d'une demande de la Commission concernant le déoxynivalénol (DON) en tant que substance indésirable dans l'alimentation animale, adopté le 2 juin 2004: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/478.Par.0005.File.dat/opinion05_contam_ej73_deoxynivalenol_v2_en1.pdf

([2]) Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM), de l'EFSA, à la suite d'une demande de la Commission concernant la zéaralénone en tant que substance indésirable dans l'alimentation animale, adopté le 28 juillet 2004: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/527.Par.0004.File.dat/opinion_contam06_ej89_zearalenone_v3_en1.pdf

([3]) Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM), de l'EFSA, à la suite d'une demande de la Commission concernant l'ochratoxine A (OTA) en tant que substance indésirable dans l'alimentation animale, adopté le 22 septembre 2004: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/645.Par.0001.File.dat/opinion_contam09_ej101_ochratoxina_en1.pdf

([4]) Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire (CONTAM), de l'EFSA, à la suite d'une demande de la Commission concernant les fumonisines en tant que substances indésirables dans l'alimentation animale, adopté le 22 juin 2005: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/contam_opinions/1037.Par.0001.File.dat/contam_op_ej235_fumonisins_en1.pdf

([5]) Recommandation 2002/214/CE de la Commission du 12 mars 2002 sur les programmes coordonnés d'inspection dans le domaine de l'alimentation animale pour l'année 2002 conformément à la directive 95/53/CE du Conseil (JO L 70 du 13.3.2002, p. 20).

([6]) Recommandation 2004/163/CE de la Commission du 17 février 2004 relative au programme coordonné d'inspection dans le domaine de l'alimentation des animaux pour l'année 2004 conformément à la directive 95/53/CE du Conseil (JO L 52 du 21.2.2004, p. 70).

([7]) Recommandation 2005/187/CE de la Commission du 2 mars 2005 relative au programme coordonné d'inspection dans le domaine de l'alimentation des animaux pour l'année 2005 conformément à la directive 95/53/CE du Conseil (JO L 62 du 9.3.2005, p. 22).

([8]) JO L 143 du 7.6.2005, p. 3.

(7) Une évaluation de la méthode prévue par la présente recommandation, servant notamment à estimer sa contribution à la protection de la santé animale, devrait être effectuée au plus tard en 2009. Les données de surveillance obtenues en application de cette recommandation permettront également de mieux comprendre les variations annuelles de la présence de ces mycotoxines dans la gamme étendue de sous-produits utilisés pour l'alimentation animale, facteur essentiel pour adopter, si nécessaire, de nouvelles mesures législatives,

RECOMMANDE:

1) Les États membres devraient, avec la participation active des exploitants du secteur de l'alimentation animale, renforcer le contrôle de la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des fumonisines B1 et B2 et des toxines T-2 et HT-2 dans les céréales et les produits à base de céréales destinés à l'alimentation animale et aux aliments composés pour animaux.

2) Les États membres devraient veiller à ce que l'analyse des échantillons porte simultanément sur la présence de déoxynivalénol, de zéaralénone, d'ochratoxine A, des fumonisines B1 et B2 et des toxines T-2 et HT-2, afin que la présence simultanée de ces substances puisse être mesurée.

3) Les États membres devraient être particulièrement attentifs à la présence de ces mycotoxines dans les sous-produits ou les coproduits alimentaires destinés aux animaux.

4) Les États membres devraient veiller à ce que les résultats des analyses soient régulièrement communiqués à la Commission, qui les rassemblera dans une base de données unique.

5) Les États membres devraient veiller à ce que les teneurs maximales recommandées établies en annexe soient appliquées pour juger de l'acceptabilité des aliments composés, des céréales et des produits à base de céréales destinés à l'alimentation des animaux. Pour les fumonisines B1 et B2, ils devraient appliquer ces teneurs maximales recommandées à compter du 1er octobre 2007.

6) Les États membres devraient notamment veiller à ce que les exploitants du secteur de l'alimentation animale utilisent les teneurs maximales recommandées visées au point 5 dans leur système d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (HACCP) [1] afin de déterminer aux points de contrôle critiques les limites critiques séparant l'acceptable de l'inacceptable, dans un but de prévention, d'élimination ou de réduction des dangers identifiés.

En les appliquant, les États membres devraient tenir compte du fait que les valeurs de teneurs maximales recommandées fixées pour les céréales et les produits à base de céréales sont déterminées pour les espèces animales les plus tolérantes, et qu'elles doivent donc être considérées comme des valeurs de référence supérieures.

Pour l'alimentation des animaux plus sensibles, les États membres devraient veiller à ce que les fabricants d'aliments pour animaux appliquent des teneurs maximales adaptées pour les céréales et les produits à base de céréales, en tenant compte de la sensibilité des espèces considérées et en faisant en sorte que les teneurs maximales recommandées fixées pour les aliments composés destinés à ces espèces puissent être respectées.

Fait à Bruxelles, le 17 août 2006.

Par la Commission

Markos KYPRIANOU

Membre de la Commission

[1] Règlement (CE) nº 183/2005 du Parlement européen et du Conseil (JO L 35 du 8.2.2005, p. 1).

ANNEXE

TENEURS MAXIMALES RECOMMANDÉES

Mycotoxine	Produits destinés à l'alimentation animale	Teneur maximale recommandée en mg/kg (ppm) pour un aliment pour animaux ayant un taux d'humidité de 12 %
Déoxynivalénol	Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux (*)	
	— les céréales et produits à base de céréales (**), excepté les sous-produits du maïs	8
	— les sous-produits du maïs	12
	Aliments complémentaires et complets excepté:	5
	— les aliments complémentaires et complets pour les porcs	0,9
	— les aliments complémentaires et complets pour les veaux (< 4 mois), les agneaux et les chevreaux	2
Zéaralénone	Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux (*)	
	— les céréales et produits à base de céréales (**), excepté les sous-produits du maïs	2
	— les sous-produits du maïs	3
	Aliments complémentaires et complets pour:	
	— les porcelets et les jeunes truies	0,1
	— les truies et les porcs d'engraissement	0,25
	— les veaux, le bétail laitier, les ovins (y compris les agneaux) et les caprins (y compris les chevreaux)	0,5
Ochratoxine A	Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux (*)	
	— les céréales et produits à base de céréales (**)	0,25
	Aliments complémentaires et complets pour:	
	— les porcs	0,05
	— la volaille	0,1
Fumonisine B1 + B2	Matières premières entrant dans la composition des aliments pour animaux (*)	
	— le maïs et les produits à base de maïs (***)	60
	Aliments complémentaires et complets pour:	
	— les porcs, les équidés, les lapins et les animaux familiers	5
	— les poissons	10
	— la volaille, les veaux (< 4 mois), les agneaux et les chevreaux	20
	— les ruminants adultes (> 4 mois) et les visons	50

(*) Il faut veiller en particulier, s'agissant des céréales et des produits à base de céréales directement utilisés pour nourrir les animaux, à ce que leur utilisation en ration journalière n'entraîne pas une exposition de l'animal à ces mycotoxines supérieure à ce qu'elle serait si la ration journalière se composait uniquement d'aliments complets.

(**) L'expression «céréales et produits à base de céréales» couvre non seulement les matières premières énumérées sous la rubrique 1 («grains de céréales, leurs produits et sous-produits») de la «liste non exclusive des principales matières premières pour aliments des animaux» figurant à la partie B de l'annexe de la directive 96/25/CE du Conseil du 29 avril 1996 concernant la circulation et l'utilisation des matières premières pour aliments des animaux (JO L 125 du 23.5.1996, p. 35), mais également les autres matières premières dérivées de céréales entrant dans la composition des produits pour animaux, notamment les fourrages et les fibres de céréales.

(***) L'expression «maïs et produits à base de maïs» couvre non seulement les matières premières à base de maïs énumérées sous la rubrique 1 («grains de céréales, leurs produits et sous-produits») de la «liste non exclusive des principales matières premières pour aliments des animaux» figurant à la partie B de l'annexe de la directive 96/25/CE du Conseil, mais également les autres matières premières dérivées du maïs entrant dans la composition des aliments pour animaux, notamment les fourrages et les fibres de maïs.

Effet de l'addition d'agents biologiques sur la présence de mycotoxines *in vitro*

V. NIDERKORN, D.P. MORGAVI, H. BOUDRA

INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores, Equipe Digestion Microbienne et Absorption, 63122 Saint-Genès-Champanelle

Des contaminations fongiques, voire mycotoxiques sont régulièrement observées sur les fourrages conservés destinés à la nutrition animale. L'objectif de ce travail est de mettre au point et valider un modèle *in vitro* pour la mise en évidence de la séquestration et/ou la biotransformation des mycotoxines par les bactéries lactiques.

Matériels et méthodes

- Bactérie modèle: *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)
- Solution d'aflatoxine B1 (AFB1) à 1µg/ml dans le milieu MRS
- Concentrations bactériennes initiales: 10^2 et 10^{10} UFC/ml
- Incubation entre 1h et 24h à 37°C puis centrifugation
- Dosage AFB1 dans le surnageant et le culot cellulaire par HPLC en phase inverse – Détection fluorescence
- Numérations bactériennes – Méthode des dilutions décimales

Résultats

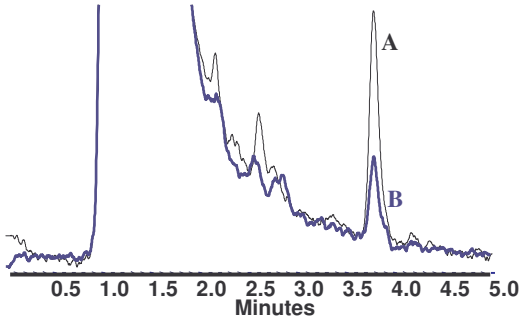
- Élimination de 40% du taux initial d'AFB1 avec 10^{10} UFC/ml après 4h d'incubation
- Faible niveau d'élimination avec une concentration bactérienne initiale de 10^2 UFC/ml ($2x10^8$ UFC/ml après 24h d'incubation)
- Recouvrements de l'AFB1 dans les surnageants et les culots cellulaires proches de 100%

Fractions d'AFB1 libres et liées après incubation avec 10^2 et 10^{10} UFC *Lb. rhamnosus* GG/ml (essais réalisés en triplicate, n=49)

Temps d'incubation (h)'	Fraction libre* (%)	Fraction liée** (%)	Recouvrement AFB1 (%)
10^{10} cellules/ml (t=0)			
1	72 ± 13	31 ± 9	102
4	54 ± 11	40 ± 8	94
10^2 cellules/ml (t=0)			
6	93 ± 3	8 ± 5	101
12	93 ± 6	2 ± 1	95
24	97 ± 3	7 ± 4	104

* AFB1 dosée dans le surnageant

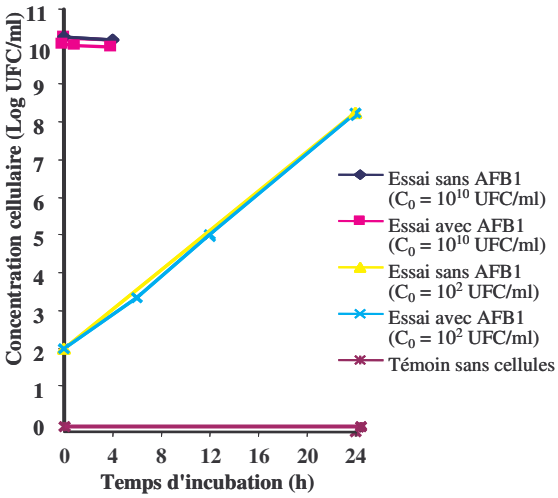
** AFB1 dosée dans le culot bactérien



Chromatogramme du témoin sans cellules (A) et de l'essai après 4h de contact avec 10^{10} UFC/ml (B)

Numérations bactériennes

- Pas de différences entre les numérations avec et sans AFB1 donc pas d'effet cytotoxique de l'AFB1 sur LGG
- Aucune croissance observée avec 10^{10} UFC/ml



Profils de concentrations bactériennes avec et sans AFB1, avec des inoculum de 10^2 et 10^{10} UFC/ml

Conclusion

- Élimination de l'AFB1 par *Lb. rhamnosus* GG dépendante de la concentration bactérienne
- Les recouvrements et les profils de concentration cellulaire montrent que le mécanisme d'élimination est une séquestration plutôt qu'une biotransformation
- Validation d'un modèle pouvant être appliqué à d'autres agents biologiques et d'autres mycotoxines

Capacité des bactéries lactiques à éliminer les fusariotoxines *in vitro*

V. NIDERKORN [1,2], D.P. MORGAVI [1], H. BOUDRA [1]

[1] INRA, Unité de Recherche sur les Herbivores, Digestion Microbienne et Absorption, 63122 Saint-Genès-Champanelle

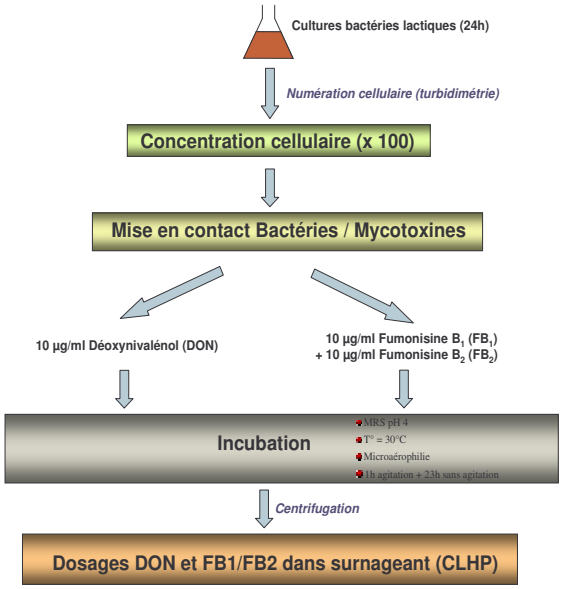
[2] Lallemand S.A.S, 19, rue des Briquetiers, B.P. 59, 31702 Blagnac Cedex

Des contaminations fongiques, voire mycotoxiques sont régulièrement observées sur les fourrages conservés destinés à la nutrition des animaux d'élevage, affectant leur santé et leurs performances zootechniques.
L'objectif de ce travail est de mettre au point et valider un modèle *in vitro* permettant la mise en évidence de la séquestration* et/ou de la biotransformation des fusariotoxines par les bactéries lactiques et ce, afin de cribler un nombre important de souches.

*** Adsorption ou liaison spécifique**

Matériels et méthodes

Modèle de criblage

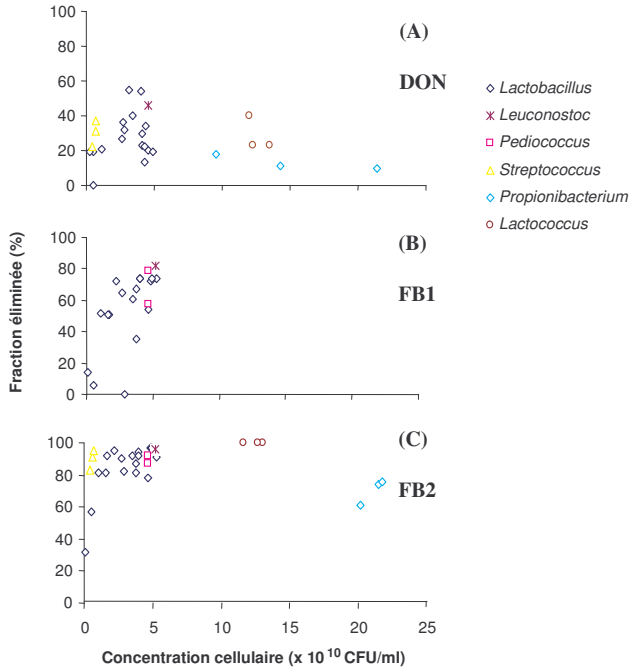


- Le modèle a été validé avec une souche bactérienne de référence *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) dont la capacité à séquestrer plusieurs mycotoxines a été démontrée (Haskard *et al*., 2000; El-Nezami *et al*., 2002).
- Un témoin sans cellule a été réalisé dans les mêmes conditions.
- Nous avons testé 30 souches appartenant à 6 genres de bactéries lactiques. Chaque essai a été réalisé en duplicate.

Résultats et discussion

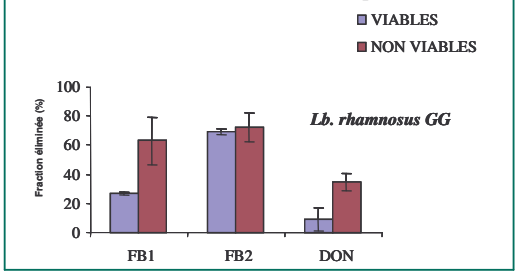
- Dans les conditions d'expérience, tous les genres bactériens testés ont montré une capacité à éliminer:
  - Le déoxynivalénol (jusqu'à 56%)
  - La fumonisine B_1 (jusqu'à 82%)
  - La fumonisine B2 (jusqu'à 100%)
- Globalement, la fraction de toxine éliminée était variable selon les souches et indépendante de la concentration bactérienne.

Fractions de fusariotoxines éliminées après contact avec différents genres de bactéries lactiques.



- L'inactivation thermique (1h à 100°C) de *Lactobacillus rhamnosus* GG conserve, voire augmente la fraction éliminée, suggérant que l'élimination est une séquestration plutôt qu'une biotransformation.

Influence de l'inactivation thermique sur l'élimination des fusariotoxines par LGG



Nous avons mis au point et validés un modèle *in vitro* permettant de mesurer la capacité des bactéries lactiques à limiter l'impact des fusariotoxines.
L'étape suivante consistera à cribler des souches issues de collections intra et extra-INRA, puis des essais seront réalisés en mini-silos et sur des animaux afin d'évaluer une possible valorisation industrielle de ces travaux.

Références

El-Nezami H. S *et al*. 2002. Food Additives and Contaminants 19(7): 680-686

Haskard C. *et al*. 2000. Chemico-Biological Interactions 128(1): 39-49

Institut National de la Recherche Agronomique

V. Niderkorn

Binding and biotransformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone to α-zearalenol by lactic acid bacteria

V. NIDERKORN[1, 2], H. BOUDRA[1], D.P. MORGAVI[1]

[1] French Institute for Agricultural Research (INRA), Clermont-Fd Research Centre, Herbivore Research Unit, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France.

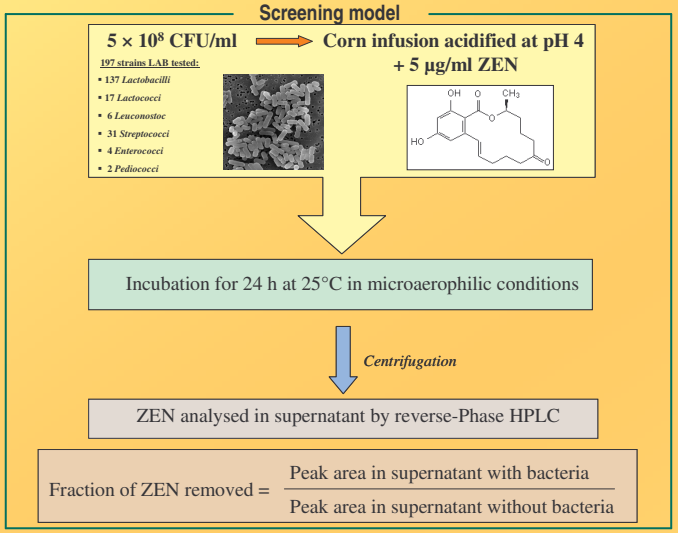
[2] Lallemand S.A.S, 19, rue des briquetiers, B.P. 59, F-31702 Blagnac, France.

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in the preparation of fermented foods and feeds and as probiotics in human and animal nutrition. Some strains of this group of bacteria have the ability to decrease the bioavailability of mycotoxins present in foods and feeds. The objective of this work was to select LAB able to detoxify zearalenone (ZEN), an estrogenic *Fusarium* mycotoxin frequently found in corn grain and silage.

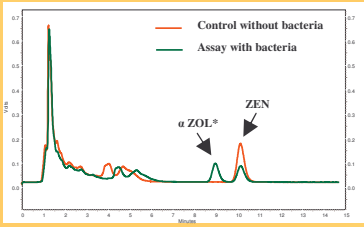
Methods

197 strains of LAB were screened for their ability to remove ZEN by either binding or biotransformation in a model representative of corn silage.



Results

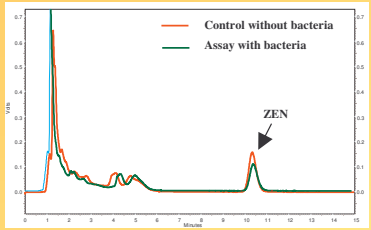
BIOTRANSFORMATION

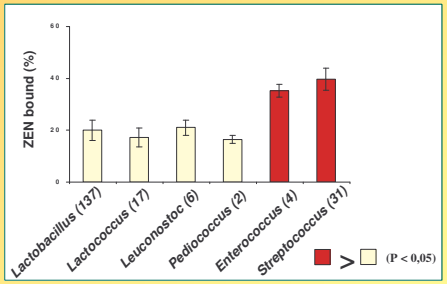


* Identification by LC-MS/MS analysis

- 11 out of 197 strains (8 *Lactobacilli* and 3 *Leuconostoc)* biotransformed up to 50% of ZEN to a single metabolite: α zearalenol (α ZOL).
- α zearalenol (α ZOL) is known to be 3 to 4 times more estrogenic than ZEN and it is thought to be the activated form of the toxin in mammals. Thus, this biotransformation cannot be considered as a detoxification.
- It could be advisable to check for the presence of α ZOL, in fermented feeds and foods. It could also be recommended to check if this property is not present in strains used as fermentation starters.

BINDING





- The genera *Streptococcus* and *Enterococcus* bound 40 and 35% of ZEN, respectively. This property could decrease the bioavailability of ZEN present in foods and feeds.

Conclusions

The ability of some strains to bind ZEN is a positive technological property. However, the biotransformation of ZEN to α-ZOL, which was identified for the first time in bacteria, cannot be considered as a detoxification.

5th joint RRI-INRA Symposium on Gut Microbiology, June 21-23, 2006

La contamination des ensilages par les fusariotoxines intervient au champ, indépendamment de tout problème de conservation. L'ingestion par les animaux d'élevage de teneurs trop élevées de ces mycotoxines peut entraîner une altération des performances zootechniques et des effets sur la santé des animaux. Face au succès partiel des méthodes de prévention et à l'inadaptabilité des méthodes physiques et chimiques de détoxification, l'utilisation des propriétés de certains microorganismes apparaît comme une alternative à considérer. L'objectif de ce travail est d'explorer la capacité des bactéries fermentaires à éliminer les fusariotoxines en vue de leur utilisation comme agent de détoxification des ensilages. Le criblage de 202 souches de bactéries fermentaires pour leur capacité à biotransformer et/ou séquestrer le déoxynivalénol (DON), la zéaralénone (ZEN) et les fumonisines B_1 et B_2 (FB_1 et FB_2) a montré que la séquestration de ces fusariotoxines majeures est une activité répandue chez ces microorganismes, les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* apparaissant comme les plus efficaces en éliminant jusqu'à 33%, 49%, 24% et 62% de DON, ZEN, FB_1 et FB_2, respectivement. Cette propriété pourrait diminuer la biodisponibilité des fusariotoxines chez l'animal et, par conséquent, réduire leur effet toxique. D'autre part, environ 5% (11/202) des souches testées ont biotransformé la ZEN en sa forme activée, l'α zéaralénol. Nous avons ensuite montré que la séquestration des fumonisines B_1 et B_2 fait intervenir le peptidoglycane de la paroi bactérienne et les bras d'acide tricarballylique (TCA) des fumonisines. La différence de séquestration de ces deux analogues ($FB_2 > FB_1$) a été élucidée par une méthode de modélisation moléculaire qui a montré que le groupe hydroxyle additionnel de la FB_1 forme une liaison hydrogène avec un des TCA, limitant ainsi la possibilité de séquestration. Des essais ont montré qu'une fraction importante de ZEN était également instantanément séquestrée par la flore du contenu ruminal, formant un complexe aussi stable dans des conditions simulant les compartiments post-ruminaux du tube digestif que celui formé entre des *Streptococci* et la ZEN. Ce niveau de séquestration pourrait contribuer à la plus forte résistance des ruminants aux effets des fusariotoxines. En conséquence, l'ajout de bactéries fermentaires pourrait être davantage utile à des animaux monogastriques plus sensibles comme le porc. Des essais *in vivo* sont cependant nécessaires pour en évaluer l'impact réel. Optimisée, la capacité des bactéries fermentaires à séquestrer les fusariotoxines pourrait compléter avantageusement les propriétés acidifiantes ou probiotiques des inoculants bactériens utilisés en nutrition animale.

Mots clés : fusariotoxines, bactéries fermentaires, biotransformation, séquestration, ensilages, détoxification, probiotiques, santé animale

The contamination of silages by fusariotoxins takes place in the field, independantly from any problem of conservation. Ingestion by livestock of silage with high concentration of these mycotoxins can cause a reduction of performances and affects animal health. Due to the partial efficiency of preventive measures and the inadaptability of physical and chemical detoxification, the use of biological detoxification methods seems a valid alternative to explore. The objective of this work was to test the ability of fermentative bacteria to remove fusariotoxins. The screening of 202 strains of fermentative bacteria for their ability to biotransform and/or bind deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) and fumonisins B_1 and B_2 (FB_1 and FB_2) showed that binding of these major fusariotoxins is widespread in these microorganisms. The genera *Streptococcus* and *Enterococcus* were the most effective with up of 33%, 49%, 24% and 62% of DON, ZEN, FB_1 and FB_2 bound, respectively. This property could decrease bioavailability of ingested fusariotoxins in animals and, thus effectively reducing their toxicity. In addition, about 5% (11/202) of tested strains biotransformed ZEN into its activated form, α zearalenol. The binding interaction was further studied in FB, I showed that peptidoglycan from bacterial cell wall is likely the binding site of FB_1 and FB_2 which are bound by their tricarballylic acid chains (TCA). The large difference in binding observed with these two analogues ($FB_2 > FB_1$) was elucidated by molecular modelling that showed that the additional hydroxyl group in FB_1 form an hydrogen bond with one TCA decreasing the binding property. Experiments showed that a large fraction of ZEN can also be bound instantaneously by ruminal fluid, forming a complex that, under conditions simulating the abomasum and small intestine, was as stable as that formed between *Streptococci* and ZEN. This binding by ruminal fluid could contribute to the resistance of ruminants to the effects of fusariotoxins. The use of fermentative bacteria to reduce toxicity could be more useful in monogastric animals like pig. However, *in vivo* studies are needed to evaluate the real impact of this technology. At term, the ability of fermentative bacteria to bind fusariotoxins could advantageously supplement the acidifying or probiotic properties of bacterial inoculants used in animal nutrition.

Keywords: fusariotoxins, fermentative bacteria, biotransformation, binding, silages, detoxification, probiotics, animal health