



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah
Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès
Centre d'Etudes Doctorales
"Sciences et Technologies"

Formation Doctorale : Molécules bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Biochimie et Biotechnologie

Laboratoire : Biotechnologie

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

CHEFCHAOU Hanane

**Composition innovante pour la lutte contre les mycotoxines et les
moisissures toxigènes :**

Application en aviculture

Soutenue le 26/11/2019 devant le jury composé de :

Pr. LAKHDISSI Hassan	(Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II)	Président
Pr. Nouredine BOUCHRITI	(Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II)	Rapporteur
Pr. Faouzi KICHOU	(Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II)	Rapporteur
Pr. Najat CHAMI	(Faculté des Sciences Dhar El Mahraz – Fès)	Rapporteur
Pr. Fouzia CHAMI	(Faculté des Sciences Dhar El Mahraz – Fès)	Examineur
Pr. Hassan HAJJAJ	(Faculté des Sciences – Meknès)	Examineur
Pr. Abdelrhafour Tantaoui-Elaraki	(Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II)	Membre invité
Dr. Mohammed Elhalaoui	(Société SAVOB)	Membre invité
Pr. REMMAL Adnane	(Faculté des Sciences Dhar El Mahraz – Fès)	Directeur de thèse

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à toutes les personnes qui me sont très chères, et avec lesquelles j'ai tout partagé :

A mes très chers parents :

En témoignage de mon amour, mon affection et ma grande reconnaissance pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien être afin que je puisse me consacrer pleinement à mes études. Je vous présente mon travail si modeste, mais qui sera certes un premier pas pour vous rendre hommage et vous remercier pour vos grands efforts accomplis à mon égard. Puisse Dieu le tout puissant vous prêter bonne santé et longue vie.

A mes chers frères Yassin, Mounir et Mohamed :

Vous qui êtes à mes côtés, pour partager mes joies. Je vous souhaite une vie comblée et une félicité éternelle et réussite.

Aux familles : CHEFCHAOU et BOUFTINI :

Je vous prie de trouver dans ce travail, le témoignage de mon affection, et ma prière pour vous de santé, de bonheur et de réussite.

A toutes mes amies

Avec lesquelles j'ai partagées mes plus beaux moments de joie et de gaités, je vous aime.

A mes collègues :

À tous les membres du laboratoire de Biotechnologie à la FSDM, bon courage à toutes et à tous, je vous souhaite une bonne continuation dans votre vie personnelle ainsi que professionnelle.

A ceux :

Qui considèrent l'ambition, la volonté et la persévérance des instruments pour aboutir à la cible désirée.

A ceux qui auront l'occasion d'avoir ce modeste travail entre les mains.

Remerciements

Au terme de ce travail, je me sens redevable à toutes les personnes qui par leur enseignement, leurs conseils ou leur amitié a contribué à sa réalisation.

Je tiens avant tout à exprimer ma sincère gratitude au **Pr Adnane Remmal**, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, il y a de nombreuses années. Il m'a permis de me former à la recherche en débutant par le stage de Master en 2013, puis en me donnant l'opportunité de continuer par une thèse au sein de son équipe ainsi que de m'avoir aidée à financer ma thèse. Je le remercie pour sa compétence scientifique, sa disponibilité, et ses conseils. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée et d'être tout simplement un modèle pour moi. J'espère que mon travail sera à la hauteur de votre confiance.

Je remercie les professeurs **Najat Chami** et **Fouzia Chami** pour tous les efforts et les aides que vous avez fournis lors de la correction de ce manuscrit sans vous, il n'aurait eu la forme présente. Voyez en ces mots l'expression de ma haute considération.

Mes plus vifs remerciements au **Pr. Dkhissi**, pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury de thèse. Qu'il me soit permis de vous témoigner ma très haute considération.

Hommages respectueux et sincères aux rapporteurs de cette thèse les professeurs **Bouchriti Nourredine**, **Faouzi Kichou** et **Najat Chami**, pour l'honneur que vous avez fait en acceptant de juger le présent travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma respectueuse admiration.

J'adresse aussi mes remerciements aux professeurs **Jaouad Berrada** et **Hassan Hajjaj**, d'avoir bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail. Merci pour votre disponibilité et pour le temps que vous avez accordé à la critique de ce travail

Je suis très honorée par la présence de **Dr Mohammed Elhalaoui** et **Pr. Abdelghafour Tantaoui-Elaraki**, d'avoir accepté d'être parmi les membres de jury de ce travail. Voyez en ces mots l'expression de mes sincères remerciements.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres du laboratoire de biotechnologie des plantes aromatiques je cite spécialement Mesdemoiselles **Aouatef Mzabi**, **Mariam Tanghort**, **Hakima Moussa** et **Soukayna Hriouech**, qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable. Merci de faire partie de ma vie, je vous dédie également cette thèse.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, je dis :

Merci 

Résumé

Tout au long de la chaîne alimentaire, depuis le champ jusqu'à l'assiette du consommateur ou la mangeoire de l'animal, tel ou tel groupe de moisissures est susceptible de se développer et de produire des toxines si les conditions écologiques, notamment l'humidité, lui sont favorables. La contamination des aliments ou des graines peut avoir lieu avant ou pendant le stockage. Les céréales concentrent l'intérêt des chercheurs en tant que des vecteurs très importants de mycotoxines car elles sont universellement consommées par l'homme et par les animaux. Elles peuvent être contaminées à plusieurs moments. La plupart des moisissures mycotoxinogènes poussent sur l'aliment, diffusent dans la masse de l'aliment, élaborent des toxines y compris dans certains produits animaliers comme la viande ou le lait et peuvent provoquer des intoxications.

Ce travail de thèse nous a permis dans un premier temps d'évaluer *in vitro* l'efficacité de l'adsorption de divers agents séquestrants de mycotoxines, dans des conditions de durée, de température et de pH proches d'un système digestif animal. Les résultats obtenus ont montré que le NP1600® est le meilleur adsorbant de différentes mycotoxines testées. Nous avons ensuite évalué *in vitro* l'activité du Mycofix®, du NP1600® et des argiles marocaines à différentes doses sur la production des mycotoxines et le développement des moisissures dans la farine de maïs, après 8 mois de stockage. Les résultats obtenus montrent une supériorité d'action du NP1600® à la faible concentration, puisqu'il a montré une grande efficacité dans la lutte à la fois contre les mycotoxines et contre la charge fongique dans le maïs.

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'effet du NP1600® ou du Mycofix® *in vivo* dans la prophylaxie de l'ochratoxicose chez le poulet de chair. Pour cela nous avons isolé et identifié les moisissures des grains de maïs contaminés naturellement, puis nous avons évalué le pouvoir toxigène de deux souches isolées et leur capacité à produire les ochratoxines. Les résultats obtenus montrent que :

- ✓ L'analyse mycologique du maïs a révélé la dominance des espèces qui appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.
- ✓ L'analyse mycotoxicologique montre qu'*Aspergillus* section des nigri est capable de produire les ochratoxines.
- ✓ Le NP1600® ou le Mycofix® permet d'améliorer en traitement préventif (2 g.kg⁻¹ d'aliment), les paramètres zootechniques des poulets gavés aux ochratoxines produites par *Aspergillus* section des nigri et de réduire le taux de l'accumulation de résidus des ochratoxines dans le foie et les reins. Avec une supériorité d'action du NP1600®.

Nous avons également étudié l'effet du NP1600® dans le traitement préventif de la mycotoxicose que nous avons induite expérimentalement chez les poulets en comparant à chaque fois le NP1600® avec le Mycofix®. Les résultats obtenus montrent que le NP1600® et le Mycofix® permettent d'améliorer en traitement préventif (2 g.kg⁻¹ d'aliment), les paramètres zootechniques, les paramètres biochimiques, le poids relatif des organes et l'accumulation de résidus de mycotoxines dans le foie et les reins des poulets, avec une supériorité d'action du NP1600®.

Mots de passe : Mycotoxines, adsorbants, NP1600®, Mycofix®, poulets, huiles essentielles, argiles marocaines, activité antifongique.

Abstract

Throughout the food chain, from the field to the consumer's plate or the animal's manger, a lot of genus of molds could be developed and produced toxins if ecological conditions, in particular, the humidity and temperature are favorable. Food or seed contamination can occur before or during storage. Cereals concentrate the interest of researchers as very important vectors of mycotoxins because they are universally consumed by humans and animals. They can be contaminated at several times. Most mycotoxigenic molds grow on the food, diffuse throughout the food, develop toxins including in certain animal products such as meat or milk and can cause poisoning.

The purpose of this study is: first, to evaluate *in vitro* the capacity of stevensite, 2 calcium bentonite, Calibrin A[®] and Z[®], Mycofix[®] and NP1600[®] for binding aflatoxins and ochratoxin in a system that mimics the digestive process in pigs, and second, to evaluate *in situ* the ability of NP1600[®], Mycofix[®] and a mixture of two clays to inhibit mold growth, and accumulation of mycotoxins during 8 months of maize flour storage. The results showed that NP1600[®] had high adsorption efficiency for aflatoxins and ochratoxine *in vitro*. In the second experiment, *in situ* actions of three adsorbing agents on mycotoxins production as well as the fungal growth in naturally contaminated maize flour was evaluated. A dose-dependent effect of adsorbents inclusion was observed on mycotoxins production ($p < 0.05$). The most important reduction of mycotoxins accumulation was observed with the NP1600[®] followed by Mycofix[®] treatments. The results showed that the NP1600[®] is the most effective adsorbent against fungal growth.

In the *in vivo* investigation, broilers were fed OTA and supplemented with NP1600[®] or Mycofix[®] at the recommended concentration of 2 g.kg⁻¹ of feed. Results indicated that feeding OTA or mycotoxins caused a reduction in body weight gain, altered relative organ weights, and serum biochemical values. Supplementing NP1600[®] or Mycofix[®] showed a significant reduction of the residue of OTA in livers and kidney tissue compared to the control group and they ameliorated the zootechnical parameters. With a superior action of the NP1600[®].

Key Words: Mycotoxins, adsorbents, NP1600[®], Mycofix[®], poultry, essential oil, Moroccan clays, antifungal activity.

Liste des tableaux

Tableau 1 : <i>Les principales moisissures et leur toxines (d'après Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; 2003).</i>	13
Tableau 2 : <i>DL50 de l'OTA chez différentes espèces animales (Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).</i>	17
Tableau 3 : <i>Avantages et inconvénients des principales techniques utilisées pour le dosage des mycotoxines (Debatty, 2000).</i>	26
Tableau 4 : <i>Quelques toxines produites par les espèces du genre Aspergillus.</i>	31
Tableau 5 : <i>Quelques toxines produites par les espèces du genre Penicillium (Pitt, 2000).</i>	33
Tableau 6 : <i>Exemples de toxines produites par les espèces du genre Fusarium (Pitt, 2000).</i>	34
Tableau 7 : <i>Composition et mode d'action supposé des sept adsorbants testés.</i>	48
Tableau 8 : <i>Conditions d'utilisation des kits pour le dosage ELISA des mycotoxines.</i>	52
Tableau 9 : <i>Pourcentages d'adsorption des aflatoxines totales (par rapport au témoin) par les différents adsorbants testés dans le tampon phosphate.</i>	55
Tableau 10 : <i>Pourcentages d'adsorption des ochratoxines (par rapport au témoin) par les différents adsorbants testés dans le tampon phosphate.</i>	56
Tableau 11 : <i>Pourcentages de réduction de la toxine T2 par les différents produits.</i>	66
Tableau 12 : <i>Pourcentages de réduction des Fumonisines totaux par les différents produits.</i>	68
Tableau 13 : <i>Pourcentages de réduction du DON par les différents produits.</i>	69
Tableau 14 : <i>Pourcentages de réduction des Aflatoxines totales par les différents produits.</i>	70
Tableau 15 : <i>Les différentes espèces constituant la flore fongique de la farine de maïs.</i>	87
Tableau 16 : <i>Production des ochratoxines par Aspergillus section des nigri et Penicillium sp sur les grains de maïs (ppb).</i>	88
Tableau 17 : <i>Dosage des mycotoxines extraites à partir de la farine de maïs.</i>	88
Tableau 18 : <i>Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le gain de poids moyen des animaux gavés aux ochratoxines.</i>	90
Tableau 19 : <i>Mortalité enregistrée chez les poulets de différents lots.</i>	90
Tableau 20 : <i>Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la consommation alimentaire hebdomadaire des animaux gavés aux ochratoxines.</i>	91
Tableau 21 : <i>Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'indice de consommation hebdomadaire des animaux gavés aux ochratoxines.</i>	91
Tableau 22 : <i>Poids relatif du foie.</i>	95
Tableau 23 : <i>Poids relatif des reins.</i>	97
Tableau 24 : <i>Résultats de l'autopsie des poulets des différents lots.</i>	98
Tableau 25 : <i>Teneur des mycotoxines dans l'aliment composé incubé.</i>	113
Tableau 26 : <i>Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le gain de poids moyen des animaux gavés aux mycotoxines.</i>	114
Tableau 27 : <i>Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la consommation alimentaire hebdomadaire des animaux gavés aux mycotoxines.</i>	115
Tableau 28 : <i>Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'indice de consommation hebdomadaire des animaux gavés aux mycotoxines.</i>	116
Tableau 29 : <i>Poids relatif du foie.</i>	119
Tableau 30 : <i>Poids relatif des reins.</i>	121
Tableau 31 : <i>Résultats de l'autopsie des poulets des différents lots à la fin de l'expérience.</i>	122

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques des aflatoxines	14
Figure 2 : Structure chimique de différentes molécules des ochratoxines	17
Figure 3 : Structure chimique de la zéaralénone.....	19
Figure 4 : Structure chimique des fumonisines.....	21
Figure 5 : Structure chimique des trichothécènes	23
Figure 6 : Origines métaboliques des différentes mycotoxines (Snini, 2014).....	27
Figure 7 : Quelques espèces du genre <i>Aspergillus</i>	30
Figure 8 : Quelques espèces du genre <i>Penicillium</i>	32
Figure 9 : Quelques espèces du genre <i>Fusarium</i>	34
Figure 10 : Protocole utilisé pour mimer l'adsorption dans des conditions de pH, de température et de temps de séjour dans un système digestif de porc (Kong et al., 2014).	49
Figure 11 : Schéma de la méthode de dosage par ELISA type compétition.	51
Figure 12 : Effet des agents fixateurs sur la concentration des aflatoxines totales dans le tampon phosphate en ng.g^{-1}	54
Figure 13 : Effet des agents fixateurs sur la concentration des ochratoxines dans le tampon phosphate en ng.g^{-1}	55
Figure 14 : Effet du NP1600, Mycofix et des argiles non activées sur la production de la toxine T2 dans les échantillons de maïs en ng.g^{-1} après 8 mois de stockage	66
Figure 15 : Effet du NP1600, Mycofix et des argiles non activées sur la production des Fumonisines totaux dans les échantillons de maïs en $\mu\text{g.g}^{-1}$ après 8 mois de stockage..	67
Figure 16 : Effet du NP1600®, Mycofix® et des argiles non activées sur la production du DON dans les échantillons de maïs en $\mu\text{g.g}^{-1}$ après 8 mois de stockage	69
Figure 17 : Effet du NP1600, Mycofix et des argiles non activées sur la production des Aflatoxines totales dans les échantillons de maïs en ng.g^{-1} après 8 mois de stockage....	70
Figure 18 : Effet des agents fixateurs sur le développement de la charge fongique exprimée en log UFC, après 8 mois de stockage de la farine de maïs	71
Figure 19 : Diagramme schématique du protocole expérimental.....	83
Figure 20 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'évolution du poids vif moyen des animaux gavés aux ochratoxines	89
Figure 21 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration en ochratoxines dans le foie des animaux gavés aux ochratoxin.....	93
Figure 22 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines au niveau des reins d'animaux gavés aux ochratoxines.....	94
Figure 23 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids des foies des animaux gavés aux ochratoxines.....	95
Figure 24 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les foies des animaux gavés aux ochratoxines.....	96
Figure 25 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids moyen des reins des animaux gavés aux ochratoxines.....	97
Figure 26 : Farine de l'aliment composé de volaille après 3 mois d'incubation	106
Figure 27 : Diagramme schématique du Protocole expérimental	108
Figure 28 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'évolution du poids vif moyen des animaux gavés aux mycotoxines	114
Figure 29 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans les foies des animaux.....	117

Figure 30 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur concentration des ochratoxines dans les reins des animaux gavés aux mycotoxines	118
Figure 31 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids des foies des animaux gavés aux mycotoxines	119
Figure 32: Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les foies des animaux gavés aux mycotoxines.....	120
Figure 33 : Comparaison entre le foie de poulet du lot témoin négatif (a) et du lot témoin positif (b)	120
Figure 34 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids des reins des animaux gavés aux mycotoxines	121
Figure 35 : Ascite d'un poulet (a : Présence d'ascite dans la cavité abdominale, b : Absence d'ascite)	123
Figure 36 : Lésions de Colibacillose chez un poulet (a : Présence de la colibacillose, b : Absence de la colibacillose)	124
Figure 37 : Pétéchies chez un poulet (a : Absence de pétéchies, b : Présence de pétéchies).....	124
Figure 38 : a : Ballonnement généralisé des intestins. b : Reins hypertrophiés	124
Figure 39 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des protéines totales des animaux gavés aux mycotoxines.....	125
Figure 40 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'Aspartate aminotransférase des animaux gavés aux mycotoxines.....	126
Figure 41 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'Alanine aminotransférase des animaux gavés aux mycotoxines.....	127
Figure 42 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration de l'urée des animaux gavés aux mycotoxines	128
Figure 43 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration de l'acide urique des animaux gavés aux mycotoxines	129
Figure 44 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration de la créatinine des animaux gavés aux mycotoxines	130
Figure 45 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration du cholestérol des animaux gavés aux mycotoxines.....	131
Figure 46 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des triglycérides des animaux gavés aux mycotoxines	132

Liste des abréviations

AFB1 : Aflatoxine B1
AFB2 : Aflatoxine B2
AFG1 : Aflatoxine G1
AFG2 : Aflatoxine G2
AFs : Aflatoxines
AFM1 : Aflatoxine M1
AFM2 : Aflatoxine M2
ALAT Alanine Aminotransférase
ASAT : Aspartate Aminotransférase
aw : Activité De L'eau
DAS : DiAcétoxyScirpénol
DL50 : Dose létale 50
DON : Déoxynivalénol
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAO : Food and Agriculture Organization
FB1 : Fumonisine B1
FB2 : Fumonisine B2
FB3 : FumonisineB3
FISA : Fédération Interprofessionnelle du Secteur Avicole
HE : Huile essentielle
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
HSCAS : Hydrated sodium calcium aluminosilicates
IC : indice de consommation
JECFA : Joint Expert Committee on Food Additives
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NIV : Nivalénol
nm : Nanomètre
NP1600 : Natural Promotor 1600
OT : Ochratoxine
OTA : Ochratoxine A
OTB : Ochratoxine B

OTC : Ochratoxine C

Pc : poids corporel

PM : Poids moléculaire

Ppb : Partie par billion

Ppm : Partie par million

T-2 : Toxine T2

ZEN : zéaralénone

Liste des publications et communications

Publications

1. **Chefchaou H**, Mzabi A, Tanghort M, Moussa H, Chami N, Chami F and Remmal A 2019: A comparative study of different mycotoxin adsorbents against DON, T2 Toxin, Aflatoxins and Fumonisin production in maize flour. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 31.
2. Mzabi A, Tanghort M, **Chefchaou H**, Moussa H, Chami N, Chami F and Remmal A. 2019. A Comparative Study of the Anticlostridial Activity of Selected Essential Oils, Their Major Components and a Natural Product with Antibiotics. *International Journal of Poultry Science*, 18: 187-194.
3. Tanghort M, **Chefchaou H**, Mzabi A, Moussa H, Chami N, Chami F and Remmal A 2019: Oocysticidal Effect of Essential Oils (Eos) And Their Major Components on *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium galli*. *International Journal of Poultry Science*. In press

Communications

1. **CHEFCHAOU Hanane**, TANGHORT Mariam, MZABI Aouatef, CHAMI Najat, CHAMI Fouzia & REMMAL Adnane. Innovation Marocaine pour une lutte globale contre les mycotoxines et les autres dangers qui menacent l'élevage au Maroc. **Congrès International** "Mycotoxines et Cancer" Faculté de Sciences SEMLALIA, Marrakech, 24 et 25 mars 2016.
2. **CHEFCHAOU Hanane**, TANGHORT Mariam, MZABI Aouatef, & REMMAL Adnane. Alternative aux antibiotiques d'élevage pour combattre l'antibiorésistance. La première édition du concours d'Innovation **INNOVADAYS « UMP-INNOVADAYS »**. Université Mohammed Premier Oujda les 9 et 10 décembre 2014. **Premier prix**

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : APERÇU SUR L'ELEVAGE DE LA VOLAILLE	2
I. GENERALITES	2
1. L'aviculture au Maroc	2
II. LES CONDITIONS D'ELEVAGE DE LA VOLAILLE	3
1. La température.....	3
2. L'eau.....	3
3. La qualité de la litière	3
4. La densité.....	4
5. L'air	4
6. L'environnement et la ventilation.....	4
7. La lumière.....	4
8. Nettoyage du bâtiment.....	5
III. L'ALIMENTATION DE LA VOLAILLE	5
1. Les céréales	5
2. Les sous-produits de céréales	6
3. D'autres produits d'origine végétale	7
4. Produits d'origine animale	7
5. Apports de nutriments	7
6. Additifs alimentaires	7
IV. PARAMETRES BIOCHIMIQUES DE LA VOLAILLE	8
1. Paramètres hépatiques	8
2. Paramètres rénaux	10
3. Paramètres lipidiques.....	11
CHAPITRE II : MYCOTOXINES ET MOISSISSURES TOXINOGENES.....	13
I. GENERALITES SUR LES MYCOTOXINES	13
1. Les aflatoxines.....	13
2. Les ochratoxines (OT)	16
3. La zéaralénone (ZEA)	19
4. Les fumonisines.....	20
5. Les trichothécènes	22
II. METHODES DE DETECTION ET DE DOSAGE DES MYCOTOXINES	25
III. BIOGÉNÈSE DES MYCOTOXINES : VOIE DE BIOSYNTHÈSE ET	
ORGANISATION DES GÈNES EN CLUSTER.....	26
IV. LES MOISSISSURES TOXINOGENES.....	29
1. Définition.....	29
2. Principaux genres fongiques.....	29
3. Conditions de toxinogénèse.....	35
V. MYCOTOXINES DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES MAROCAINES..	37
1. Les mycotoxines dans les céréales et dérivés	38
2. Les mycotoxines dans les fruits secs	39
3. Les mycotoxines dans les épices	39
VI. METHODES DE REDUCTION DU TAUX DE MYCOTOXINES DANS LES	
ALIMENTS.....	40
1. Elimination des mycotoxines.....	40
2. Méthodes chimiques.....	40
3. Méthodes physiques	40
4. Adsorption	40
V. REGLEMENTATION DES MYCOTOXINES.....	43
1. A l'échelle internationale	43
2. A l'échelle nationale	44
PRESENTATION DU TRAVAIL	45
PARTIE I : EVALUATION <i>IN VITRO</i> DE L'ADSORPTION DES MYCOTOXINES..	46

CHAPITRE I : EVALUATION DE LA FIXATION DES AFLATOXINES ET DES OCHRATOXINES PAR LE NP1600® : APPROCHE <i>IN VITRO</i>	47
I. INTRODUCTION	47
II. MATERIEL ET METHODES	48
1. Les agents adsorbants	48
2. Préparation des mycotoxines	48
3. Protocole d'adsorption <i>in vitro</i> mimant les conditions d'un système digestif	49
4. Dosage des mycotoxines par la technique d'ELISA par compétition directe	49
5. Pourcentage d'adsorption	52
6. Etude statistique	53
III. RESULTATS	54
1. Pourcentage d'adsorption des aflatoxines <i>in vitro</i> par les sept produits testés	54
2. Pourcentage d'adsorption des ochratoxines <i>in vitro</i> par les sept produits testés	55
IV. DISCUSSION	57
1. L'adsorption des aflatoxines	58
2. L'adsorption des ochratoxines	58
CHAPITRE II : EVALUATION <i>IN SITU</i> DE L'ACTION DU MYCOFIX®, DU NP1600® ET DES ARGILES MAROCAINES SUR LA PRODUCTION DES MYCOTOXINES ET LE DEVELOPPEMENT DES MOISSURES DANS LA FARINE DE MAÏS	60
I. INTRODUCTION	61
II. MATERIEL ET METHODES	62
1. Les fixateurs	62
2. Préparation des échantillons de maïs	62
3. Dosage des mycotoxines par la technique d'ELISA par compétition directe	63
4. Action du NP1600®, du Mycofix® ou du mélange d'argiles sur le développement de la charge fongique dans la farine de maïs	63
5. Etude statistique	64
III. RESULTATS	65
1. Dosage de la toxine T2	65
2. Dosage des Fumonisines totaux	66
3. Dosage du Déoxynivalénol (DON)	68
4. Dosage des aflatoxines totales	69
5. Action des produits sur le développement de la charge fongique dans les échantillons de maïs	71
IV. DISCUSSION	72
1. L'activité du Mycofix®, du NP1600® et des argiles marocaines sur la production des mycotoxines dans la farine de maïs	74
2. Effet du NP1600®, du Mycofix® et des argiles non activées sur le développement de la charge fongique dans les échantillons de maïs	75
V. CONCLUSION	77
PARTIE II : EVALUATION DE L'ACTION DU NP1600® OU DU MYCOFIX® <i>IN VIVO</i> DANS LA LUTTE CONTRE LES MYCOTOXINES CHEZ LE POULET DE CHAIR 78	
CHAPITRE I : EVALUATION DE L'ACTION DU NP1600® ET DU MYCOFIX® <i>IN VIVO</i> DANS LA PROPHYLAXIE DE L'OCHRATOXICOSE CHEZ LE POULET DE CHAIR	79
I. INTRODUCTION	79
II. MATERIEL ET METHODES	80
1. Isolement et identification des moisissures du maïs	80
2. Production des ochratoxines par les isolats d' <i>Aspergillus section des nigri</i> et <i>Penicillium sp</i>	81
3. Evaluation de l'action du NP1600® ou du Mycofix® <i>in vivo</i> dans la prophylaxie de l'ochratoxicose chez le poulet de chair	82
4. Autopsie	86
5. Etude statistique	86
III. RESULTATS	87

1.	Identification des différents isolats de moisissures	87
2.	Pouvoir toxigène d'Aspergillus section des nigri et de Penicillium sp isolées	87
3.	Dosage des mycotoxines extraites à partir de la farine de maïs	88
4.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés aux ochratoxines	88
5.	Dosage de l'ochratoxine dans le foie et dans les reins des poulets.....	92
6.	Etude des caractéristiques des organes	94
7.	Résultats des autopsies	98
IV.	DISCUSSION.....	99
1.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés aux ochratoxines	101
2.	L'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans les foies et les reins des animaux gavés aux ochratoxines.....	102
3.	L'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids relatif des foies et des reins des animaux	102
V.	CONCLUSION.....	104
I.	INTRODUCTION	105
II.	MATERIEL ET METHODES	106
1.	Les produits utilisés	106
2.	Préparation de la solution de mycotoxines	106
3.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés par les mycotoxines	108
4.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres biochimiques des animaux gavés aux mycotoxines	110
5.	Autopsie.....	112
6.	Etude statistique.....	112
III.	RESULTATS	113
1.	Dosage des mycotoxines extraites de l'aliment composé incubé	113
2.	Détermination des paramètres zootechniques	113
3.	Dosage des ochratoxines dans le foie et les reins des poulets	116
4.	Etude des caractéristiques des organes (Abats).....	118
5.	Résultats des autopsies	122
6.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres biochimiques des animaux gavés aux mycotoxines	125
IV.	DISCUSSION.....	133
1.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés aux mycotoxines	134
2.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids relatif des foies et des reins des animaux gavés aux mycotoxines	135
3.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans les foies et les reins des animaux.....	136
4.	Autopsies	136
5.	Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres biochimiques des animaux gavés aux mycotoxines	137
V.	CONCLUSION.....	140
	CONCLUSION GENERALE.....	141
	PERSPECTIVES ENVISAGÉES	143
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144

INTRODUCTION GENERALE

Chapitre I : Aperçu sur l'élevage de la volaille

I. Généralités

Le développement du secteur avicole à l'échelle mondiale et l'augmentation de la production de poulets de chair dès les années 60 ont conduit à une diminution progressive et continue des prix de la viande de volaille. Cette diminution ne cesse de s'accroître grâce à la maîtrise des conditions techniques et sanitaires de production, et aux avancées technologiques impliquant l'amélioration génétique et de la diversification des productions avicoles. Dans certains pays, particulièrement aux Etats-Unis, le fort accroissement de la demande des consommateurs a été déterminant dans cette dynamique (FAO, 2017). La production mondiale de viande de volaille a progressé au rythme de 5% par an dès les années 90. L'essentiel de cette dynamique provient des pays comme la Chine, le Brésil, le Mexique et la Thaïlande, mais l'augmentation de la consommation a concerné la plupart des pays depuis 1990, ce qui a entraîné une expansion rapide des échanges dans le monde (FAO, 2017).

En 2015, la consommation totale de viande de volaille prête à la vente dans le monde était supérieure de 3,4% par rapport à la moyenne de la dernière décennie. L'année 2014, cette consommation a cependant baissé à 2,3%, à cause de la croissance démographique.

1. L'aviculture au Maroc

Avec un taux d'accroissement de la production 6% pour les viandes de la volaille et de 5,7% pour les œufs de consommation, le secteur avicole constitue l'une des activités agricoles les plus dynamiques au Maroc (FISA, 2018).

Compte tenu des prix relativement bas par rapport aux autres denrées d'origine animale, les produits avicoles sont consommés par l'ensemble de la population et constituent un recours pour l'amélioration de la sécurité alimentaire de notre pays en termes de protéines d'origine animale, (Avec une production en 2017 de 640000 tonnes de viande de volaille et 5,5 milliards d'œufs de consommation), ce secteur couvre actuellement 100% des besoins aussi bien en viandes qu'en œufs de consommation (FISA, 2018).

Le secteur avicole en chiffres

En 2017, le secteur avicole a fourni une production de 550.000 tonnes de viande de poulet de chair, 90.000 tonnes de viande de dinde, 490 millions de poussins type chair, 14,0 millions de poussins type ponte et 10,8 millions de dindonneaux locaux.

II. Les conditions d'élevage de la volaille

Les poussins et les dindonneaux ont besoin de conditions optimales d'élevage dès leur arrivée au bâtiment : une litière propre, une température adéquate, de l'eau et de l'aliment à volonté. La bonne préparation du bâtiment est une condition indispensable pour la réussite du démarrage de l'élevage. Tous ces facteurs sont interdépendants, la défaillance de l'un d'entre eux pourra affecter négativement la performance globale.

1. La température

Les poussins sont incapables de régler leur propre température corporelle jusqu'à l'âge de 12-14 jours. Cependant, ils ont besoin d'une température optimale dans le bâtiment. La température du sol est aussi importante que celle de l'air, d'où la nécessité de préchauffer le bâtiment. La température doit se stabiliser à 30°C, au moins 24 heures avant de recevoir le lot. Des températures trop élevées provoquent une baisse de la consommation d'aliment et une baisse de l'efficacité des échanges gazeux respiratoires. Toutefois, durant la phase d'emplumement qui s'étale de 1 jour à 3 semaines d'âge, les poulets sont sensibles au froid. Après emplumement, ils présentent une bonne isolation et sont plutôt sensibles aux excès de chaleur. Donc tout inconfort thermique peut avoir des répercussions sur l'équilibre physiologique de l'animal, son état de santé et ses performances zootechniques (Tesseraud et Temim., 1999).

2. L'eau

Les oiseaux doivent avoir de l'eau fraîche et propre disponible à tout moment. A une température normale, un poulet boit environ 1,5 à 2 fois plus qu'il mange. Au delà de 30°C les besoins en eau augmentent considérablement et peuvent être multipliés par 3 ou 4. Cette eau supplémentaire n'est pas utilisée par le tube digestif mais par les poumons. A ce niveau, l'évaporation d'eau participe au maintien de la température du corps des poulets et permet de lutter contre les fortes chaleurs. Chez le poussin, un manque d'eau se traduit par une déshydratation rapide entraînant une mortalité parfois élevée (Djerou, 2006).

3. La qualité de la litière

Pour l'élevage avicole, des litières de paille ou de copeaux de bois sont utilisées. Elles doivent être réparties uniformément, à une épaisseur de 8-10 cm. (Djerou, 2006). La qualité de la litière influe sur la santé de la volaille, puisque des niveaux bas d'humidité dans la litière réduisent le taux d'ammoniaque dans l'atmosphère et aideront donc, à réduire aussi bien le stress respiratoire, que l'incidence de dermatite.

4. La densité

La densité qui définit le nombre d'animaux par unité de surface est un paramètre important que l'aviculteur doit contrôler durant les différentes phases d'élevage. Des densités excessives entraînent des baisses de performances qui se manifestent par la réduction de croissance, la diminution de l'homogénéité, l'augmentation de l'indice de consommation et l'augmentation de la mortalité (Martrenchar et *al.*, 1997).

5. L'air

Les principaux contaminants de l'air du bâtiment sont la poussière, l'ammoniac, le dioxyde de carbone et l'excès de vapeur d'eau. Lorsque le niveau de ces contaminants est assez haut, ces derniers affectent le tractus respiratoire des poulets, et diminuent leurs performances en général, ce qui déclenche des maladies respiratoires chroniques (Djerou, 2006).

6. L'environnement et la ventilation

Pour que la volaille soit dans un bon environnement, il faut contrôler la ventilation du bâtiment. Les poulets requièrent une bonne qualité de l'air d'une manière constante et uniforme dans toutes les étapes de sa croissance.

Une ventilation efficace doit éliminer l'excès de chaleur et d'humidité, apporter de l'oxygène et éliminer les gaz nocifs, car au fur et à mesure que les poulets croissent, ils consomment plus d'oxygène, et éliminent des gaz nocifs et de la vapeur d'eau (Robertson et Friebe, 1984).

7. La lumière

La lumière joue un rôle important dans le comportement alimentaire et, par conséquent, la croissance des poulets. Les zootechniciens ont testé des régimes d'éclairage variés, et les ont classés en trois grandes catégories : l'éclairage constant (24 ou 23 heures de lumière), l'éclairage incluant une période d'obscurité (6 heures) et le troisième régime d'éclairage est un régime fractionné (2 heures de lumière et 2 heures d'obscurité) (Gordon, 1994 ; Hester, 1994). Martrenchar et Morisse (1997) ont montré que les programmes fractionnés sont les plus performants sur le plan de la productivité, alors que les régimes continus avec une augmentation progressive de la durée d'éclairement réduisent les troubles locomoteurs.

Une autre étude menée par Valancony en 1999 sur trois programmes lumineux, a permis de conclure que l'éclairage constant de 23 heures de lumière est celui qui permet d'obtenir les meilleures performances de croissance des poulets.

8. Nettoyage du bâtiment

La volaille est soumise aux pressions de différents agents infectieux : les virus, les bactéries, les moisissures et les parasites notamment les coccidies. Pour y remédier, les éleveurs ont recours aux vaccins, aux médicaments et à la biosécurité. Mais, appliquées seules, ces procédures sont inefficaces pour prévenir les pertes provoquées par les maladies. Afin d'assurer une bonne protection des normes de biosécurité sont appliquées, on procède à un vide sanitaire selon la loi 49-99, après chaque bande d'élevage (nouvelle bande : c'est la mise en place des poussins d'1 jour, qui vont être élevés jusqu'à l'enlèvement pour l'abattage.), il s'agit d'enlever la litière et dépoussiérer les murs, les orifices de ventilation ainsi que les salles de service. Après un bon lavage du bâtiment et de l'équipement, la désinfection de toutes les surfaces intérieures du bâtiment et toutes les pièces d'équipement doit être effectuée en utilisant un pulvérisateur à haute pression (Maris, 1989).

III. L'alimentation de la volaille

L'aliment doit être administré en quantité suffisante et doit contenir les éléments nécessaires dans des proportions équilibrées. Il se présente comme un assemblage d'ingrédients variés qui fait appel à la matière première composée de céréales, de sous-produits des céréales, et d'autres produits d'origine végétale ou animale, des vitamines, des minéraux et des additifs alimentaires (Labrier et Leclecq, 1992).

L'aliment que consomme le poulet conditionne sa production. Cette consommation varie en fonction de l'âge de l'animal, de la souche, de l'environnement (température, ventilation,...), de la forme de l'aliment (granulé, farine ou miette) et de la digestibilité de l'aliment.

1. Les céréales

1.1 Le maïs

Le maïs constitue une céréale de choix pour l'alimentation des volailles en raison de sa faible teneur en amidon et de sa valeur énergétique élevée (3200 à 3800 kcal / kg de matière sèche (MS)). Généralement, l'amidon du maïs est celui qui présente la digestibilité la plus élevée chez la volaille (98 %) (Larbier et Lec1ercq, 1992). Cependant, le maïs est pauvre en protéines (7 à 12 % MS) et en acides aminés tels que la lysine et le tryptophane, raison pour laquelle il est habituellement associé à d'autres matières riches en protéines telles que les tourteaux et oléagineux (soja) (Vias, 1995). Le maïs est riche en pigments xanthophylles (17 mg / kg MS) particulièrement disponibles et très efficaces pour la coloration du jaune de l'œuf et de la peau

des animaux génétiquement aptes à fixer ces pigments. Ces substances ne présentent aucune valeur nutritionnelle mais donnent à l'œuf sa couleur jaune orangée.

1.2 Le blé

Le blé est très utilisé en alimentation aviaire. Il peut substituer entièrement le maïs dans les rations des monogastriques. Il est très riche en amidon qui représente son principal hydrate de carbone (De Blas et *al.*, 1995). Cependant, ses pentosanes présentes en quantités variables sont difficilement digérées. Le blé contient peu de matière grasse, ce qui évite l'accumulation de la graisse non saturée dans la chair de la volaille quand il est inclu en grande quantité dans les rations alimentaires (Fernandez et Ruiz Matas, 2003).

1.3 Le sorgho

Le Sorgho est une céréale secondaire fréquemment utilisée dans l'alimentation de la volaille. C'est un aliment riche en énergie à cause de sa forte teneur en amidon et de la présence des matières grasses. Comme le maïs, le Sorgho est pauvre en protéines et la disponibilité du phosphore est faible. Le principal problème dans l'utilisation des sorghos réside dans les tanins (présents en teneurs variables) qui donnent de l'amertume à l'aliment (Lacassagne, 1988).

1.4 Les brisures de riz

Les brisures de riz sont des grains de riz cassés qui sont triés après le polissage. C'est une matière première de grande valeur énergétique mais qui est pauvre en protéines. Après broyage, elle entre largement dans l'alimentation de la volaille, à condition de l'associer à d'autres matières riches en protéines et en acides aminés (Duron, 1999).

2. Les sous-produits de céréales

2.1 Le son de blé

Le son de blé est un sous-produit traditionnellement utilisé en alimentation animale. Il est constitué de particules fines de pellicules des grains de blé, séparées au moment de la production de la farine. Il contient également des particules de germes de blé. C'est un produit plus riche en protéines que le blé entier, riche en phosphore, en vitamines du groupe B et en manganèse (De Blas et *al.*, 1995).

2.2 Le son de riz

Le son de riz est le sous-produit du polissage du riz. Il est disponible pratiquement dans tous les pays chauds et essentiellement constitué du péricarpe du grain de riz.

3. D'autres produits d'origine végétale

Les tourteaux sont des sous-produits des huileries qui, à cause de leur richesse en protéines, présentent un grand intérêt dans l'alimentation animale. La valeur nutritionnelle protéique des tourteaux varie en fonction de l'espèce végétale d'origine et de la technique de fabrication. Les tourteaux utilisés sont ceux d'arachides, de tournesol et de soja.

4. Produits d'origine animale

Les farines animales sont des sous-produits de l'industrie des viandes et des poissons. Elles sont valorisées dans les mélanges destinés à la volaille dans les élevages industriels, c'est à dire pour les élevages de type moderne où la volaille n'a pas la possibilité de trouver des sources de protéines animales comme les vers, les insectes, etc. Ainsi, elles sont utilisées en alimentation de volaille comme source de protéines, de vitamines et de sels minéraux. Ce sont essentiellement les farines de viande et de poissons.

5. Apports de nutriments

Afin d'optimiser la productivité tout en maintenant une bonne santé de la volaille, un apport constant en acides aminés essentiels, en minéraux et en vitamines est nécessaire (FAO, 2014).

5.1 Les acides aminés essentiels

Les acides aminés essentiels doivent être apportés dans l'aliment, car l'animal est absolument incapable de les synthétiser. Ce sont la méthionine, la lysine, la thréonine et le tryptophane.

5.2 Le prémix

Les prémix sont des concentrés d'oligo-éléments, de vitamines, d'enzymes et de minéraux. Ils sont associés en faible pourcentage aux différentes matières premières pour constituer l'aliment complet à destination des animaux d'élevage.

6. Additifs alimentaires

Les additifs alimentaires sont utilisés dans l'alimentation animale (comme stimulateurs de croissance) afin d'améliorer les performances de croissance animale et notamment de la volaille. Ils contribuent à améliorer l'homogénéité d'un lot de poulets lorsque celui-ci est soumis à des conditions d'élevage difficiles telles que le surpeuplement, le stress et les fortes températures. Parmi les principaux additifs utilisés, on peut citer les antibiotiques, les anticoccidiens et les fixateurs de mycotoxines.

Les antibiotiques : certains antibiotiques sont employés comme stimulateurs de croissance. Les doses incorporées dans les aliments sont beaucoup plus faibles que les doses thérapeutiques. Ils

agissent par modification de la flore intestinale, en réduisant la population de bactéries à Gram+ (Bedford, 2000). Cependant, l'utilisation des antibiotiques pour augmenter les performances zootechniques représente une menace potentielle pour le consommateur. Les principaux risques encourus sont une accumulation de résidus toxiques et d'allergènes dans la chair de la volaille et l'apparition de souches de micro-organismes pathogènes résistantes aux antibiotiques (Bager et *al.*, 1997 ; Roe et Pilla., 2003 ; Mackie et *al.*, 2006).

Les Anticoccidiens: le tube digestif du poulet héberge plusieurs espèces parasites. Par leur cycle de développement, il peut se produire une infestation par des coccidies. Ainsi, pour empêcher cette infestation qui engendre une baisse des performances zootechniques, un anticoccidien est systématiquement utilisé de manière préventive dans l'aliment. Ces anticoccidiens doivent être retirés de l'aliment quelques jours avant l'abattage des poulets pour éviter la présence de résidus dans la chair de la volaille. Pour la même raison, ils sont déconseillés chez la poule pondeuse (Kaldhusdal, 2003).

Les fixateurs de mycotoxines : Ces produits peuvent être ajoutés à l'aliment et visent à réduire l'absorption intestinale des toxines en les liant ou en les transformant en produits moins toxiques. Les qualités d'un bon fixateur de toxines sont multiples : une efficacité démontrée *in vivo* sur les animaux, un large spectre d'adsorption, un faible taux d'inclusion, l'absence de liaison avec les vitamines ou oligo-éléments et un coût justifiant une certaine rentabilité. Il existe plusieurs types de fixateurs de toxines. La plupart sont très efficaces à lier l'aflatoxine qui est une toxine polaire très facilement adsorbable. La première catégorie de fixateurs de toxines concerne les aluminosilicates (traités ou non) et le charbon (activé ou non). Ces produits ont bien souvent une efficacité prouvée essentiellement sur les toxines polaires comme l'aflatoxine (Bailey, 2006). Néanmoins, ils peuvent présenter un problème de sélectivité (ex. : liaison de vitamines) et leur taux d'incorporation est parfois élevé. Une autre catégorie comprend les produits à base de parois de levures (β -glucan) qui ont entre autres démontré une certaine efficacité sur la zéaralénone (Yiannikouris, 2004). Le dernier type de fixateur de toxines est constitué d'une combinaison d'enzymes et de bactéries permettant de transformer les mycotoxines en composés moins toxiques (Schatzmayr, 2004).

IV. Paramètres biochimiques de la volaille

1. Paramètres hépatiques

En raison des multiples rôles du foie, la fonction hépatique peut être évaluée par plusieurs dosages qui sont les protéines totales et les marqueurs de lyse cellulaire qui sont l'alanine amino-transférase (ALAT) et l'aspartate amino-transférase (ASAT).

1.1 Protéines totales

1.1.1 Fonction- régulation

Les protéines plasmatiques constituent un ensemble de substances chimiques hétérogènes. On distingue grossièrement les albumines, les globulines (α , β , γ) et le fibrinogène. Elles participent à l'homéostasie et assurent le transport des substances endogènes et exogènes ; elles interviennent dans la régulation de la pression osmotique grâce à leur pouvoir oncotique, dans la protection de l'organisme contre les agressions externes sous forme d'immunoglobulines, ainsi que dans certains processus métaboliques sous forme d'enzymes ou d'hormones. Elles sont en grande partie synthétisées par le foie qui assure leur stockage dans le muscle (Robert et Gerald, 1983).

1.1.2 Interprétation

Lorsque la concentration des protéines totales est inférieure à 30 g.l⁻¹, l'hypoprotéïnémie s'installe. Elle peut être due soit à une affection chronique rénale ou hépatique, à un syndrome de mal absorption, à un parasitisme sanguin ou à un néoplasme (Campbell et Coles, 1984 ; Aman, 1986). L'hyperprotéïnémie est observée lorsque la concentration est supérieure à 60 g.l⁻¹ lors de maladies chroniques (tuberculose aviaire, aspergillose, septicémie bactérienne, chlamydiose) (Roskopf et *al.*, 1981). Elle est également constatée lors d'intoxication par les amines biogènes et notamment l'histamine ou suite à une déshydratation (El Yassouri, 2005).

1.2 Aspartate Aminotransférase (ASAT)

1.2.1 Fonction- régulation

Les ASAT sont présentes dans le muscle squelettique et le myocarde. On en trouve aussi dans le foie et les tissus nerveux. Les ASAT sont donc un indicateur sensible mais non spécifique de souffrance musculaire. Ces enzymes sont des marqueurs de cytolysse hépatique, mais ne sont pas spécifiques du tissu hépatique (Hochleithner, 2013).

1.2.2 Interprétation

Une cytolysse hépatique est responsable de l'augmentation des ASAT par libération dans le sang des contenus cellulaires. Une insuffisance rénale peut également provoquer une augmentation du taux des ASAT sanguines, il s'agit d'un marqueur particulièrement sensible lors d'atteinte des cellules tubulaires proximales. Toute affection générale (septicémie, virémie ou toxémie) par le biais de lyses cellulaires importantes est également responsable d'une augmentation du niveau d'ASAT (Hochleithner, 2013).

1.3 Alanine Aminotransférase (ALAT)

1.3.1 Fonction- régulation

L'alanine aminotransférase, appelée également la transaminase glutamo-pyruvique (TGP), est une enzyme cytoplasmique avec une répartition tissulaire variable chez les oiseaux selon les espèces. En effet, chez les poulets et les oies, le cœur, les muscles squelettiques, le foie et les poumons contiennent peu d'ALAT. Chez les canards, l'activité de l'ALAT est élevée dans le muscle squelettique, et faible dans le foie et le cœur (Campbell et Coles, 1986).

1.3.2 Interprétation

Des augmentations de l'activité sérique de l'ALAT ont été observées dans des cas graves de troubles hépatiques (Campbell et Coles, 1986).

2. Paramètres rénaux

La fonction rénale peut être évaluée par plusieurs dosages : ceux de l'acide urique, de l'urée et de la créatinine.

2.1 Acide urique

2.1.1 Fonction-régulation

L'acide urique est le principal déchet du catabolisme des protéines, de l'azote non protéique et de la dégradation de l'adénine, la guanine et l'hypoxanthine. Ces derniers ont une triple origine : alimentaire (pour une faible part), purinosynthèse endogène et catabolisme des acides nucléiques. L'acide urique est excrété par les reins essentiellement par excrétion tubulaire.

2.1.2 Interprétation

L'hyperuricémie est souvent induite par des affections rénales primaires ou secondaires engendrant une goutte articulaire ou viscérale (Campbell et Coles, 1986 ; Hamet, 1986). L'hypouricémie peut être due à une diminution de synthèse de l'acide urique (insuffisance hépatique), à une augmentation de l'excrétion urinaire de l'acide urique qui peut être idiopathique, à un traitement médicamenteux inhibant la synthèse de l'acide urique ou augmentant sa clairance (Aman, 1986).

2.2 L'urée

2.2.1 Fonction-régulation

L'urée est le produit ultime du métabolisme azoté. Elle est biosynthétisée dans le foie à partir de l'ammoniac (NH_3) par désamination des acides aminés. C'est un paramètre important pour

l'évaluation de l'intégrité du fonctionnement rénal, hépatique et l'état de nutrition de l'animal (Coles, 1979 ; Kaneko, 1989).

2.2.2 Interprétation

L'augmentation de l'urémie est observée lors d'une diminution de l'élimination de l'urée suite à une néphropathie, à une goutte articulaire ou viscérale ou lors d'une déshydratation. Elle diminue lors de maladies hépatiques ou d'insuffisance des apports azotés dans la ration alimentaire (Coles, 1979).

2.3 La créatinine

2.3.1 Fonction-régulation

La créatinine est une substance azotée non protéique produite au cours du métabolisme musculaire (Rodwell, 2002). Son excrétion se fait par les reins, où elle est librement filtrée et réabsorbée dans les tubules.

2.3.2 Interprétation

L'hypercréatinémie peut être secondaire à une maladie rénale primitive, à un traumatisme, à une néphrotoxicité, à une septicémie (chlamydie) (Roskopf et *al.*, 1982 ; Woerpel et Roskopf, 1984 ; Aman, 1986). Elle a été observée chez le poulet lors de l'administration d'une ration alimentaire contenant de la farine de poisson avec un taux très élevé en histamine (El Yassouri, 2005).

3. Paramètres lipidiques

3.1 Le cholestérol

3.1.1 Fonction- régulation

Le cholestérol est un lipide majeur, précurseur de l'ensemble des hormones stéroïdes et des sels biliaires. C'est aussi un composant majeur des membranes cellulaires animales, qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides. La synthèse du cholestérol se fait dans le cytoplasme des cellules du foie et de l'intestin principalement (Hochleithner, 2013).

3.1.2 Interprétation

L'hypercholestérolémie est observée en cas d'hypothyroïdisme, de xanthomatose, de stéatose hépatique, d'obstruction biliaire ou d'une alimentation riche en graisses (Woerpel et Roskopf, 1984 ; Campbell et Coles, 1986 ; Aman, 1986).

L'hypocholestérolémie peut être due à une septicémie bactérienne ou à une insuffisance hépatique grave (Woerpel et Roskopf, 1984 ; Campbell et Coles, 1986), mais aussi à une intoxication par l'histamine chez le poulet (El Yassouri, 2005).

3.2 Les triglycérides

3.2.1 Fonction- régulation

Les triglycérides sont des lipides de réserve. Ils ont un rôle fondamental, ils constituent une réserve d'énergie très importante (énergie grâce aux acides gras et au glycérol). Ils sont intensément fabriqués dans le foie et dans les cellules intestinales. Les triglycérides proviennent aussi des graisses apportées par l'alimentation (Hochleitner, 2013).

3.2.2 Interprétation

La triglycéridémie a été insuffisamment investiguée chez la volaille. Ses valeurs peuvent varier selon le climat, l'influence hormonale, l'alimentation, et l'espèce. Des hypertriglycéridémies (2-5 g.⁻¹) ont été observées en cas de lipidose hépatique, et de péritonite en particulier chez les femelles, et en cas d'hyperadrénocorticisme (Hochleithner, 2013).

Chapitre II : Mycotoxines et moisissures toxinogènes

I. Généralités sur les mycotoxines

Le terme mycotoxine est utilisé pour décrire des métabolites de moisissures présentant une action toxique à faible dose sur les animaux. Plusieurs sortes de mycotoxines sont retrouvées dans les céréales. Les mycotoxines sont produites par certains champignons filamenteux comme *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. et *Penicillium* spp. (Bennett et Klich, 2003), qui se développent sur les plantes céréalières ou agissent comme saprophytes sur les récoltes entreposées (Glenn, 2007). Les mycotoxines présentent des propriétés toxiques lorsqu'elles sont ingérées par les animaux. Ces dernières peuvent subir une perte de croissance substantielle et développer divers signes cliniques tels que la diarrhée et des hémorragies, pouvant être d'issue fatale de l'animal (Cast, 2003). Les principales moisissures et leurs toxines sont représentées dans le tableau 1. Il existe 300 à 400 types de mycotoxines. Elles appartiennent à des familles très diverses de molécules. Les plus importantes dans le secteur agro-alimentaire et sanitaire sont les aflatoxines, les ochratoxines, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone et les trichothécènes (AFSSA, 2006).

Tableau 1 : Les principales moisissures et leur toxines (d'après Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; 2003).

Champignons	Toxines	Produits sensibles
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot	Blé et dérivés, seigle
<i>Fusarium</i>	-Trichothécène (DON, toxine T-2, DAS, NIV), -Zéaralénone, -Fumonisines et fusarine	Maïs, blé, orge, riz, seigle, avoine
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines, ochratoxine A	Maïs, blé
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, ochratoxine A	Blé, riz, orge

1. Les aflatoxines

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires d'origine fongique produits par les champignons du genre *Aspergillus* : *A. flavus* et *A. parasiticus* (Tedesco et al., 2004 ; Denli et Okan, 2006 ; Denli et al., 2009). Elles constituent une famille de composés extrêmement toxiques. Elles contaminent fréquemment l'alimentation avicole (Ledoux et al., 1998). Le mot aflatoxine est formé à partir du genre *Aspergillus* pour la lettre « A », de l'espèce *flavus* pour les

trois lettres « fla » et de toxine qui veut dire poison : c'est donc une toxine d'*A. flavus* (Mandiouba, 1992).

Les aflatoxines sont des mycotoxines produites après la récolte, car elles sont issues de moisissures qui se développent lors du stockage ou du transport (Yiannikouris et *al.*, 2002). De part leur toxicité importante et les innombrables productions qu'elles affectent, les aflatoxines font l'objet d'une vigilance particulière durant les transports internationaux de céréales.

Les aflatoxines sont une famille de composés structurellement proches. Parmi eux, seuls six sont toxiques et ont été trouvés comme contaminants naturels : AFB1, AFB2, AFM1, AFM2 AFG1 et AFG2 (Bathily, 1998). Selon Pfohl-Leszkowicz (1999) et Nguyen (2007), la toxicité des aflatoxines s'échelonne dans l'ordre suivant : B1 (100%) ; M1 (80%) ; G1 (50%) ; B2 (20%) ; G2 (10%). L'AFB1 est la mycotoxine la plus toxique et qui cause des pertes énormes en aviculture (Hussein et Brasel, 2001; Tedesco et *al.*, 2004) et dans les industries de transformation alimentaire (Kubena et *al.*, 1998).

1.1 Structure chimique

Les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proches (un assemblage d'une coumarine et de 3 furanes). Les plus courantes sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFM1, l'AFM2, l'AFG1 et l'AFG2 (Figure 1). Le cycle lactone de l'AFB1 semble être responsable en majorité de sa toxicité (Lee et *al.*, 1981).

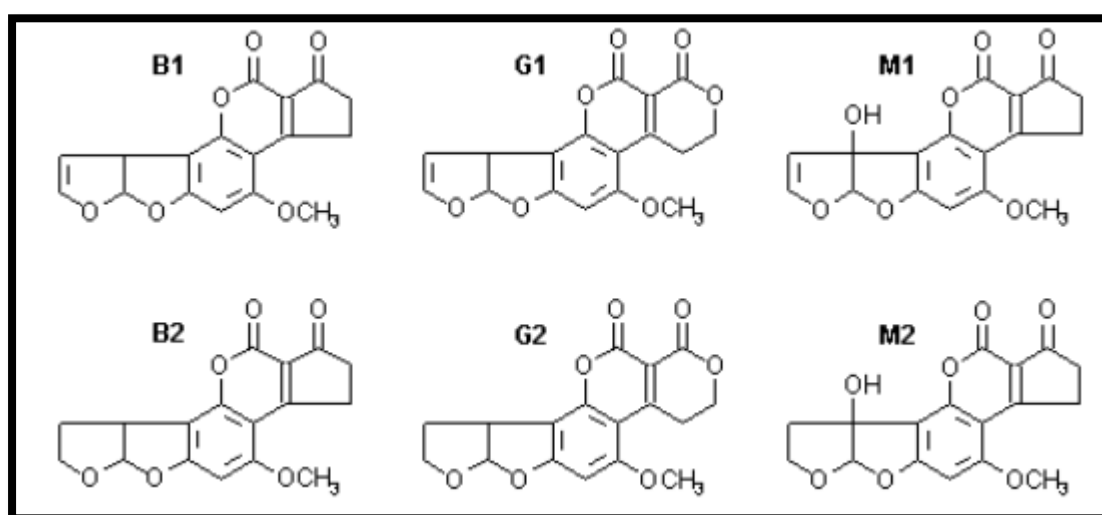


Figure 1 : Structures chimiques des aflatoxines

L'aflatoxine provoque des toxicités aiguës ou chroniques au niveau de diverses cellules.

1.2 Toxicité aiguë

L'intoxication aiguë par les aflatoxines résulte de l'ingestion en une seule ou plusieurs fois rapprochées d'une dose assez importante d'aflatoxines et se traduit par la mort des animaux dans des délais variant selon la sensibilité des espèces.

L'intoxication aiguë par l'AFB1 se manifeste par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids, un ictère, une ascite et enfin la mort de l'animal atteint (Ochieng et *al.*, 2016).

1.3 Toxicité chronique

Les aflatoxicoses chroniques surviennent à la suite d'ingestions répétées de faibles doses d'aflatoxines pendant des périodes plus ou moins longues et sont plus fréquentes chez les animaux domestiques et chez l'Homme (Moreau, 1994 ; Abrunhosa et *al.*, 2016). Cela se traduit par des effets insidieux comme la baisse des performances zootechniques et une prédisposition accrue à des maladies et ceci à la suite d'une défaillance du système immunitaire.

Chez les animaux en général et particulièrement chez les poulets de chair, plusieurs effets ont été décrits tels que l'immunotoxicité, la cancérogénicité et l'hépatotoxicité (Denli et Okan, 2006).

1.3.1 Immunotoxicité

Les travaux de Dugyala et Sharma, (1996) et de Liu et *al.*, (2002) chez l'animal ont montré que l'AFB1 exerce des propriétés immunosuppressives affectant en particulier l'immunité à médiation cellulaire par inhibition de la phagocytose, diminution de la production de radicaux oxygénés et altération de la production de cytokines. Son effet sur l'immunité à médiation humorale s'observe pour des expositions plus élevées, variables d'une espèce animale à une autre (Bondy et Pestka, 2000 ; Oswald et *al.*, 2003). Selon Hatori et *al.*, (1991), Moon et *al.*, (1999) et Luongo et *al.* (2013), les effets immunosuppresseurs de l'AFB1 semblent dus à l'altération de la synthèse d'acides nucléiques et de protéines avec diminution de la prolifération, de la maturation cellulaire et de la production des cytokines.

1.3.2 Cancérogénicité

La propriété toxique majeure de l'AFB1 est son pouvoir cancérigène. En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez l'Homme et les animaux (Kensler et *al.*, 2018). Pour cette raison, elle est classée par le Centre International de Recherche sur le Cancer dans le groupe I (ça veut dire qu'elle est cancérigène pour l'Homme) (Pfohl- Leszkowicz, 1999).

1.3.3 Hépatotoxicité

En raison de ses capacités de bioactivation, le foie est la cible principale des AFs (Khanian et *al.*, 2019). La principale conséquence d'une intoxication grave par les AFs est la nécrose hépatique qui se traduit par une forte augmentation des transaminases plasmatiques. Cette nécrose est associée à une infiltration de cellules inflammatoires (Meissonnier et *al.*, 2005). D'après Castegnaro et Pfohl-leszkowicz, (2006), la susceptibilité de la volaille à l'hépatotoxicité est très variable suivant l'espèce animale. Le dindon est moins sensible aux lésions hépatiques que le canard. Chez le poussin, l'ingestion d'aliments contaminés par 2,5 ppm d'AFB1 pendant 3 semaines, provoque un ictère, un retard de croissance et des troubles de la coagulation sanguine (Chattopadhyay et *al.*, 1985).

2. Les ochratoxines (OT)

L'Ochratoxine A a été découverte comme un métabolite d'*Aspergillus ochraceus* en 1965 par van der Merwe et *al.* Il s'est avéré par la suite qu'elle est produite par différentes espèces de *Penicillium* (*P. verrucosum*, *viridicatum*...) et d'*Aspergillus* (*A. niger*, *A. ochraceus*, ...). Elle fait partie de la famille des ochratoxines qui compte une dizaine de molécules connues. Parmi les 3 ochratoxines fréquemment rencontrées l'OTA, l'OTB et l'OTC, l'ochratoxine A (OTA) est la plus toxique.

Elle est souvent trouvée dans les produits d'origine végétale tels que les céréales, le café, le vin, la bière, le cacao, les épices et le jus de raisin, mais aussi dans des produits d'origine animale, en l'occurrence des rognons de porc (Marquardt et Frohlich, 1992 ; Van Egmond et Speijers, 1994 ; Pitt, 2000). L'OTA est une mycotoxine mortelle pour la volaille (Hamilton et *al.*, 1982 ; Burns et Dwivedi, 1986 ; Hameed et *al.*, 2013).

2.1 Structure chimique

Les ochratoxines constituent une famille de toxines contenant une isocoumarine parfois chlorée couplée par une liaison amide à une molécule de L-phénylalanine (Figure 2).

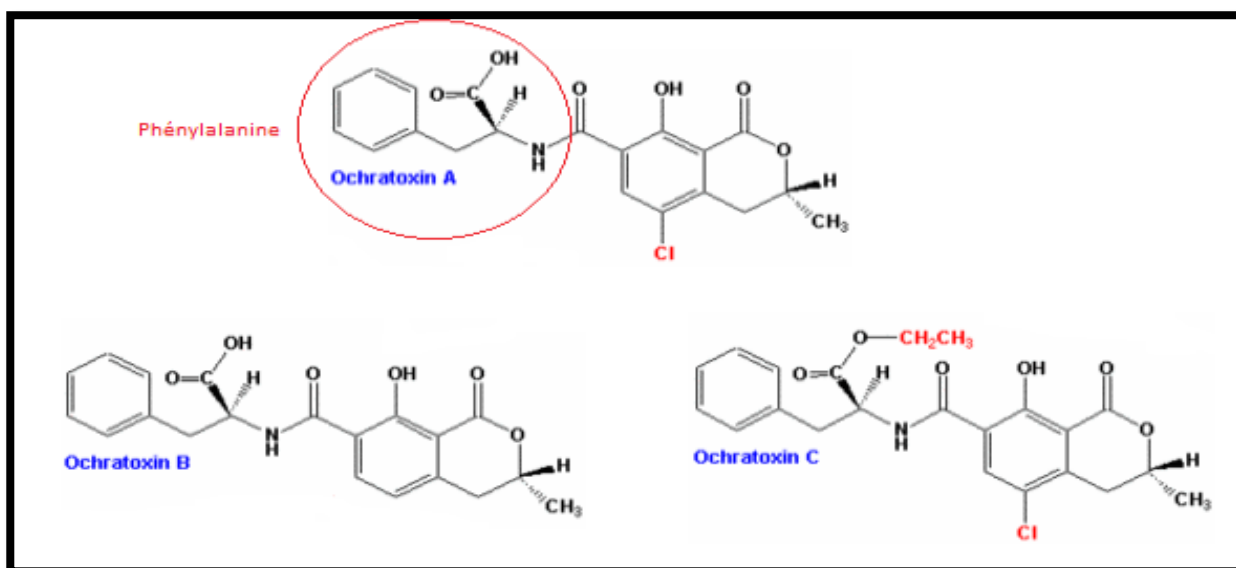


Figure 2 : Structure chimique de différentes molécules des ochratoxines

2.2 Toxicité aiguë

Les doses létales 50 (DL50) de l'OTA chez différentes espèces animales figurent dans le tableau 2. La toxicité aiguë de l'OTA varie en fonction de l'espèce animale, du sexe et de la voie d'administration. L'intoxication provoquée par l'OTA se caractérise par des hémorragies et des diarrhées Pfohl-Leszkowicz et *al.*, 2002). D'après Pfohl-Leszkowicz (1999), le rein étant l'organe cible de l'OTA.

Tableau 2 : DL50 de l'OTA chez différentes espèces animales (Pfohl-Leszkowicz et *al.*, 2002)

Animal	Souris Swiss (mâle)	Rat (mâle-femelle)	Poulet	Dinde	Porc	Chien	Cobaye
DL50 (mg.kg ⁻¹ de poids)	51-68	28-21,4	3,3	5,9	1	0,2	9,1-8,1
Voie d'administration	Orale	Orale	Orale	Orale	Intrapéritonéale	Orale	Orale

2.3 Toxicité chronique

L'exposition des animaux à de faibles doses d'OTA est à l'origine de néphrotoxicité et de carcinogénicité des voies urinaires. L'OTA est aussi mutagène, tératogène et neurotoxique (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; JECFA, 2001).

2.3.1 Néphrotoxicité

Selon Pfohl-Leszkowicz et Manderville (2007) et Zhao et *al.*, (2017), l'OTA est potentiellement néphrotoxique pour plusieurs espèces animales. Les ruminants adultes font cependant l'exception. Des études effectuées par Hamilton et *al.* (1982) ont montré que l'OTA peut jouer

un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine. Ces mêmes auteurs ont montré que les lésions rénales chez le poulet sont associées à l'ingestion de cette mycotoxine. L'OTA a été également associée à la néphropathie des humains (Lopez De Cerain et *al.*, 2002 ; Blesa et *al.*, 2004).

2.3.2 Carcinogénicité

Plusieurs études ont porté sur le développement de cancers expérimentaux chez des animaux nourris pendant quelques semaines avec des doses d'OTA variables. Il s'agit de tumeurs hépatiques mais surtout rénales (Huff et *al.*, 1992). Ainsi, l'OTA seule peut entraîner, chez les rongeurs, la formation de cancers du rein, du foie et des glandes mammaires. Dans une étude de carcinogénicité sur des rats Fischer F344 (Mantle et *al.*, 2005), de l'OTA à raison de 100 µg/jour a été administrée via l'alimentation. Les premières tumeurs ont été découvertes après 75 semaines chez les rats ayant ingéré de l'OTA. 20 % des rats avaient des carcinomes dans les reins et le parenchyme rénal. Il y avait des métastases au niveau du mésentère abdominal, parfois aussi au niveau des poumons (Mantle et *al.*, 2005). Suite à ces études, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé en 1993, l'OTA comme une molécule cancérigène possible pour les humains (groupe 2B).

2.3.3 Mutagénicité

Une activité mutagène par test d'Ames (qui est un test biologique permettant de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique), a été mise en évidence par l'équipe de Hennig et *al.* (1991) après métabolisation de l'OTA par des hépatocytes de rat. Ces auteurs ont constaté une induction d'échanges de chromatides sœurs dans des lymphocytes humains cultivés dans un milieu contenant de l'OTA métabolisée par ces mêmes hépatocytes.

2.3.4 Tératogénicité

D'après Pfohl-Leszkowicz (2001 ; 2012), l'OTA est tératogène chez l'animal. Elle provoque des anomalies morphologiques diverses chez les embryons du rat, de la souris, du hamster, du porc et du poulet. Celles-ci incluent aussi, des malformations fœtales, une perte de poids des fœtus, une proportion anormale de fœtus présentant des hémorragies, une réduction de la taille des portées avec un retard de croissance, des anomalies au niveau des viscères et du squelette et une mortalité fœtale augmentée.

2.3.5 Neurotoxicité

Chez le rat l'administration d'OTA pendant la période de gestation induit des malformations du système nerveux central (Pfohl-Leszkowicz, 1999). De même, Eskola (2002) et Soleas et *al.*

(2001) ont rapporté que l'OTA peut être considérée comme cause possible de certaines lésions ainsi que des dégâts au niveau cérébral. Cette substance s'avère donc hautement toxique pour les cellules nerveuses et apte à atteindre le tissu neural (cerveau, rétine) (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Bhat et *al.*, 2016).

3. La zéaralénone (ZEA)

La zéaralénone est une mycotoxine oestrogénique non stéroïdienne, issue du métabolisme secondaire de nombreuses espèces de champignons du genre *Fusarium* : *F. gramineum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. semitectum* ou *Gibberella zeae*, (Chelkowski, 1998). Ces moisissures peuvent se retrouver dans les céréales, notamment lorsque celles-ci sont stockées à des températures relativement basses et exposées à l'humidité. La ZEA a été isolée pour la première fois en 1962 par Stob et *al.* sur du maïs contaminé par *Gibberella zeae*.

3.1 Structure chimique

Selon Hagler (2005), la structure chimique de la zéaralénone présente des analogies avec celle des œstrogènes. Du point de vue chimique, la ZEA est une lactone macrocyclique de l'acide résorcyclique sans toxicité intrinsèque (Whitlow et *al.*, 2001).

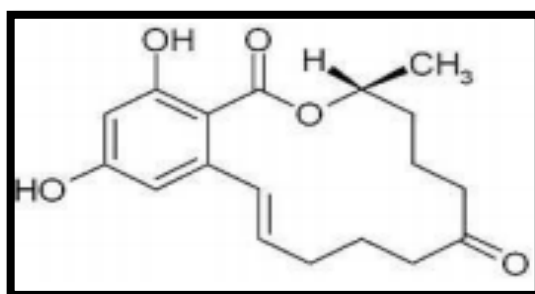


Figure 3 : Structure chimique de la zéaralénone

3.2 Toxicité aiguë

Une étude réalisée par EFSA (2011) a montré qu'après une administration par voie orale, la ZEA engendre une faible toxicité aiguë chez la souris, le rat et le cochon d'Inde (DL 50 orale > 2000 mg.kg⁻¹ de poids corporel). Selon Abbes et *al.* (2006), l'administration orale d'une dose unique de 40 mg.kg⁻¹ de poids corporel à des souris est responsable d'une infiltration lymphoïde du foie et d'une réduction des glomérules rénaux. Aussi, des études menées par Creppy (2002) et Zinedine et *al.* (2007a) ont rapporté que la ZEA est plus toxique par voie intra-péritonéale. L'administration d'une dose unique de ZEA chez la souris par cette voie intra-péritonéale (1,5,

3 et 5 mg.kg⁻¹ de poids corporel) est à l'origine de perturbations hépatiques et hématologiques significatives (Maaroufi et *al.*, 1996).

3.3 Toxicité chronique

3.3.1 Carcinogénicité

La zéaralénone induit des cancers de foie et de la glande pituitaire, mais à des doses nettement supérieures aux doses engendrant un effet hormonal (WHO, 2002 ; De Ruyck et *al.*, 2015). Pour cette raison, elle n'est pas considérée comme étant elle-même cancérigène. Les effets seraient dus à l'effet hormonal (Creppy, 2002, EFSA, 2011).

3.3.2 Génotoxicité

Les études *in vivo* chez la souris et chez le porc réalisées par Ouanes et *al.* (2003) et Cieplińska et *al.* (2018), confirment le potentiel cytogénétique de la ZEN. En effet, elle induit la formation de micro noyaux dans les cellules de la moelle osseuse de souris après administration orale de 10 à 40 mg.kg⁻¹ de poids corporel/jour, et des aberrations chromosomiques chez la souris et le rat après administration intra-péritonéale (Ouanes et *al.*, 2005 ; Creppy, 2002 ; Gaumy et *al.*, 2001 ; Zinedine et *al.*, 2007a).

3.3.3 Immunotoxicité

De nombreuses études montrent les effets immunotoxiques de la ZEA dans des modèles *in vitro*. La ZEA est ainsi capable de diminuer la prolifération de lymphocytes périphériques et la production de cytokines et d'anticorps du rat, lorsqu'elle est administrée à des doses fortes (40-80 mg.kg⁻¹ pc par jour) (Salah-Abbes et *al.*, 2008 et 2010).

Selon les recherches effectuées par Berek et *al.*, (2001) ; Vlata et *al.*, (2006) ; Marin et *al.* (2010) ; Marin et *al.*, (2011) et Reddy et *al.*, (2018), la ZEA inhibe également la prolifération des monocytes du sang périphérique humains et porcins et des neutrophiles porcins et réduit la production de cytokines et d'anticorps (IgG, IgA et IgM).

4. Les fumonisines

Les fumonisines constituent un groupe de mycotoxines qui sont identifiées relativement tardivement en 1988. Elles sont élaborées par des espèces de *Fusarium* qui sont principalement *F. verticilloides* (anciennement *F. moniliforme*) et *F. proliferatum*. Ces moisissures extrêmement répandues dans le maïs produisent de grandes quantités de diverses fumonisines B1, B2 et B3 (Diaz, et *al.*, 1994 ; Wit et *al.*, 2018). La fumonisine B1 étant la principale toxine dans ce groupe.

4.1 Structure chimique

Les fumonisines ont une structure similaire à celle de la sphingosine qui sert d'ossature aux sphingolipides. Quatre structures de fumonisines ont été identifiées à ce jour A, B, C et P, mais seules les structures de la série B sont des produits retrouvés dans la nature, la fumonisine B1 (FB1) restant la plus abondante (figure 4).

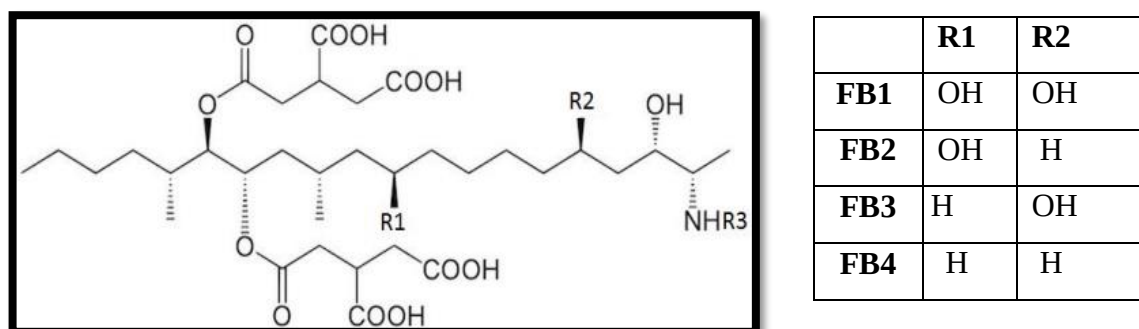


Figure 4 : Structure chimique des fumonisines

4.2 Effets toxiques

Selon Diaz et *al.* (1994) et Braun et *al.* (2018), le mécanisme d'action de la FB1 repose sur l'analogie structurale entre la toxine et la sphingosine. Cette analogie est à l'origine de l'inhibition de la N-acyltransférase et de la perturbation de la biosynthèse des sphingolipides. Cela se traduit, sur le plan cellulaire, par l'accumulation de sphinganine, parfois de sphingosine, qui sont deux composés hautement réactionnels pouvant perturber le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire. La FB1 peut causer des mycotoxicoses aiguës chez les animaux comme le porc et le cheval. Elle provoque la leukoencephalomalacie chez les équidés et des oedèmes pulmonaires chez le porc. La FB1 est également hépatotoxique et néphrotoxique pour le porc, le rat, la souris et le lapin (Dutton, 1996).

4.3 Toxicité chronique.

4.3.1 Cancérogénèse

Les expériences effectuées par Gelderblom et *al.* (2001), montrent que l'administration prolongée de FB1 à des rongeurs de laboratoire entraîne l'apparition de tumeurs hépatiques. Chez l'homme, la FB1 est suspectée d'être impliquée dans la forte prévalence des cancers de l'œsophage observée dans certains pays comme l'Afrique du Sud et la Chine (Luo et *al.*, 1990 ; Yoshizawa et *al.*, 1994). Pour ces raisons, la FB1 a été classée par l'International Agency for Research on Cancer (IARC) en 2000 dans le groupe B2 des molécules cancérigènes chez l'animal et potentiellement cancérigènes chez l'Homme.

4.3.2 Embryotoxicité et tératogénèse

La FB1 affecte les fœtus des rates en gestation engendrant la diminution de poids et perturbant le développement du squelette. Lors d'études *in vitro* et *in vivo*, il a été montré que la FB1 est embryotoxique, elle diminue la croissance et le développement des embryons de rats, et apparaît comme potentiellement embryotoxique et tératogène chez la volaille (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Lumsangkul et *al.*, 2019).

4.3.3 Immunotoxicité

L'administration de FB1 par voie orale rend les animaux immunodéprimés (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Abbès et *al.*, 2016). Elle conduit *in vitro*, à des phénomènes de cytotoxicité des macrophages de poulet avec renflements membranaires. Ces molécules diminueraient la prolifération lymphocytaire ainsi que la synthèse de certaines immunoglobulines (Osweiler et *al.*, 1993 ; Rotter et *al.*, 1996 ; Martinova et Merrill, 1995).

5. Les trichothécènes

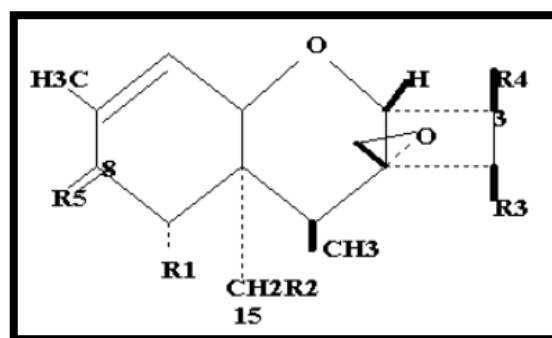
Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par plusieurs espèces de *Fusarium* et ceux de genres apparentés. Les trichothécènes forment une famille comprenant 200 à 300 composés. Au sein de cette famille de mycotoxines, les plus couramment détectés dans les produits agricoles sont la toxine déoxynivalénol (DON encore appelé vomitoxine) et la toxine T-2.

La contamination par ces mycotoxines commence avant la récolte, puisque les moisissures du genre *Fusarium* parasitent les plantes au champ. Mais elles peuvent se poursuivre au cours du stockage et du transport des grains. Elles sont très répandues dans les régions tempérées et humides. (Hagler, 2005 ; Schollenberger et *al.*, 2005 ; Tabuc, 2007).

5.1 Structure chimique

Les trichothécènes constituent une grande famille de mycotoxines (Figure 5) composées de 2 groupes :

- Groupe A : constitué par les trichothécènes qui n'ont pas de fonction cétone en C8. Les plus importants sont la toxine T-2, la toxine HT-2 et le diacétoxyscirpénol (DAS).
- Groupe B : constitué par les trichothécènes ayant une fonction cétone en C8. Les plus importants sont le déoxynivalénol (DON) et ses formes acétylées, le nivalénol (NIV), et la fusarénone-X (FX).



	R1	R2	R3	R4	R5
Toxine T-2	OH	CH ₃ COO ⁻	CH ₃ COO ⁻	H	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COO ⁻
DON	OH	H ₂	OH	OH	O

Figure 5 : Structure chimique des trichothécènes

5.2 Le déoxynivalénol (DON) ou Vomitoxine

Le Déoxynivalénol est l'une des mycotoxines les plus couramment détectées dans les aliments (Hagler, 2005 ; EFSA, 2013 ; Woo et *al.*, 2015). Il est aussi appelé vomitoxine car au départ, il était associé à des vomissements chez le porc. Outre sa fréquence de détections dans les différents aliments, le DON est utilisé comme marqueur pour savoir si les récoltes ont été exposées ou non à des situations favorisant l'élaboration de mycotoxines par des moisissures du genre *Fusarium* : *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. culmorum* (Whitlow, et *al.*, 2001 ; Bueno et *al.*, 2005 ; Tabuc, 2007).

5.2.1 Effets toxiques

La dose létale (DL50) du DON par voie orale chez la souris varie de 46 à 78 mg.kg⁻¹ de poids vif. De nombreux cas d'intoxication chez le porc par des céréales contaminées par cette toxine ont été rapportés, notamment aux Etats-Unis. Chez le porc, espèce considérée comme la plus sensible, la consommation d'aliments contaminés par le DON peut provoquer la diminution de la croissance pondérale, des vomissements, des diarrhées, des symptômes neurologiques, des lésions dermatologiques et une réduction de la réponse vaccinale (Rotter et *al.*, 1996 ; D'Mello et *al.*, 1999 ; Avantaggiato et *al.*, 2004).

Selon Pestka et Smolinski (2005) le DON présente des effets stimulateurs ou déprimeurs sur le système immunitaire, en fonction de la dose administrée et de la durée d'exposition. De fortes doses de DON vont provoquer une déplétion des globules blancs circulants, la réduction du taux

d'IgM et d'IgG dans le sérum, la diminution de la résistance aux pathogènes et l'inhibition de la réponse antigénique.

Dänicke et *al.*, (2001) ; EFSA (2004) et Wang et Hogan (2018) ont montré que les signes d'intoxication aiguë par le DON chez la volaille sont dominés par des troubles nerveux (hyperpnée, léthargie, perte d'équilibre), et digestifs (diarrhée, refus d'aliment) et des signes de l'intoxication chronique par une altération de la croissance, de la production d'œufs parfois accompagnées de lésions cutanées.

5.3 Toxine T2 (T-2)

Bien qu'elle soit produite par un certain nombre de moisissures, c'est principalement par *Fusarium sporotrichioides* et *F. poae* que la Toxine T2 est élaborée. Cette toxine fongique très puissante n'est retrouvée que dans un nombre restreint de prélèvements (<10% aux Etats-Unis principalement dans l'orge, le blé, le millet, les graines de carthame et les rations mélangées (Hagler et *al.*, 2005).

5.3.1 Toxicité aiguë

Les effets observés lors des études de toxicité aiguë de la toxine T-2 chez l'animal concernent principalement des symptômes non spécifiques observés chez le rat tels que la perte de poids, l'inappétence, les vomissements, les diarrhées, les dermatites, les hémorragies et les nécroses de l'épithélium gastrique et intestinal et ceux de la moelle osseuse, des testicules et des ovaires. Chez les rongeurs, la dose létale (DL50) de la toxine T-2 est comprise entre 3 et 10 mg.kg⁻¹ de poids vif corporel (Trenholm et *al.*, 1989 ; Jacevic et *al.*, 2018).

5.3.2 Toxicité chronique

Les études de toxicité chronique de la toxine T-2 ont montré des lésions de l'épithélium de l'œsophage chez les rats, une diminution du gain du poids, des modifications des paramètres hématologiques et immunitaires chez les porcs, telle une diminution du nombre des leucocytes (Jagadeesan et *al.*, 1982). Des études sur la volaille menées par Pestka et Bondy, (1994) ; Rotter et *al.*, (1996) ; Pande et *al.*, (2006) et Jayanthi et *al.*, (2018) ont démontré qu'une intoxication avec la toxine T-2 peut provoquer une réduction dans le gain de poids, des lésions au bec, un plumage pauvre, un affaiblissement des fonctions motrices et une augmentation de la prédisposition à *Salmonella* spp.

II. Méthodes de détection et de dosage des mycotoxines

La recherche des mycotoxines, dans le cadre du contrôle réglementaire des aliments, exige l'utilisation de méthodes de dosage aux performances analytiques reconnues. Aucune méthode analytique, aussi performante soit-elle, ne pourrait donner des résultats représentatifs du lot examiné sans un échantillonnage représentatif. En plus du respect des critères habituels de linéarité et de sensibilité, ces méthodes doivent présenter un degré de fiabilité élevé qui peut se mesurer par les paramètres de fidélité (répétabilité et reproductibilité) et d'exactitude (mesurée par le taux de récupération). De même, il est important de vérifier l'adéquation entre le seuil de détection d'une méthode et les teneurs maximales tolérées qui sont définies par les textes réglementaires ou les recommandations de comités d'experts (Dragacci et Frémy, 1999).

Certaines méthodes simplifiées peuvent être utilisées sur le terrain ou pour une analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons. Cependant, ces méthodes sont non officielles et non valides. Pour cela, un échantillon qui donne un résultat positif par l'une de ces techniques devra être confirmé par une méthode de référence, préconisée par un organisme officiel ou interprofessionnel, et qui sera très fiable. Certaines méthodes analytiques sont validées par essai interlaboratoire sur des échantillons contaminés naturellement ou par addition à plusieurs taux (Dragacci et Frémy, 1999).

Pour analyser les mycotoxines, habituellement présentes à l'état de traces dans les aliments, il existe un grand nombre de méthodes fondées essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules puis leur détection par spectrophotométrie ou fluorimétrie. Ces méthodes physico-chimiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie gazeuse (GC) ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permettent toujours la quantification des molécules. D'autres méthodes utilisent le principe de l'immunoanalyse. Ainsi, les techniques immunochimiques de type ELISA autorisent suivant leur configuration, soit une détection de type présence ou absence (résultats qualitatifs), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine. Ces techniques immunochimiques sont souvent qualifiées de rapides, car de nombreux échantillons peuvent être analysés simultanément, ou bien dites de terrain car leur utilisation est possible hors d'un laboratoire sans appareils de mesure particuliers ou sophistiqués (lecture visuelle de certains tests) (Dragacci et Frémy, 1999). Ainsi, les différentes méthodes de référence sont classées soit selon leur principe fondamental de fonctionnement (techniques physico-chimiques ou immunochimiques), soit selon les performances qu'elles permettent d'atteindre (analyse qualitative ou quantitative)

(Debatty, 2000). Le tableau 3 présente les principales techniques utilisées pour le dosage des mycotoxines.

Tableau 3: *Avantages et inconvénients des principales techniques utilisées pour le dosage des mycotoxines (Debatty, 2000)*

Techniques	Sensibilité	Spécificité	Avantages	Inconvénients
HPLC/FLUO	++++	++	Sensible	-Dérivation -Purification
HPLC/UV	++	++	Pas de dérivation	-Peu spécifique -Purification
ELISA	+++	+++	Coût	Peu spécifique
CCM	+	+	Simple	-Peu sensible -Peu spécifique
4GC/MS	++	+++	Sensible	-Dérivation -Purification
HPLC/MS/MS	++++	++++	-Sensible -Spécifique	Coût appareil

III. Biogénèse des mycotoxines : Voie de biosynthèse et organisation des gènes en cluster

Les mycotoxines couvrent une gamme très vaste de familles chimiques. C'est la conséquence du métabolisme secondaire fongique. Le métabolisme secondaire diffère du métabolisme primaire par la nature aléatoire de son activation et par la diversité des composés formés et la spécificité des souches impliquées. Il n'est pas lié à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (Yiannikouris et Jouany, 2002). Si le métabolisme primaire est commun à toutes les espèces fongiques et se rapproche des voies métaboliques générales permettant la synthèse et le catabolisme des glucides, lipides et protéines, le métabolisme secondaire peut être en revanche spécifique d'une espèce, voire d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques. Il y aurait, selon les auteurs des centaines de mycotoxines répertoriées. Seule une vingtaine est considérée comme potentiellement dangereuse pour l'homme et l'animal, du fait de leur production et concentration dans les produits alimentaires. Le rôle des toxines fongiques est d'améliorer la compétitivité des champignons, assurant un moyen de défense pour les champignons.

Les voies de biosynthèse des mycotoxines sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendu

possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (Steyn, 1980 ; Luchese et Harrigan, 1993). La majeure partie des mycotoxines comporte des hétérocycles insaturés présentant des doubles liaisons carbonées (C=C) dans leur structure, qui sont à l'origine de leurs propriétés toxiques et carcinogènes. Les mycotoxines appartiennent à différentes catégories biosynthétiques et dérivent de précurseurs issus du métabolisme primaire tels que l'acétyl-CoA (comme pour les aflatoxines, les fumonisines, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la patuline et l'ochratoxine A), les acides aminés (alcaloïde de l'ergot, ochratoxine A) ou les terpènes (trichothécènes, PR-toxine). Elles impliquent respectivement l'activation de polycétide synthase (PKS), de non-ribosomal peptide synthétase (NRPS) et de terpènes cyclase (TC). Selon la recherche menée par Boettger et Hertweck (2013), la diversité structurale des mycotoxines résulte de la variété des réactions chimiques (cyclisation, aromatisation, glycosylation, hydroxylation et époxydation) impliquées dans leur biosynthèse. La fusion des voies de biosynthèses des polycétoacides et des peptides cycliques non-ribosomiques, conduit à l'obtention d'hybrides polycétoacides/peptides cycliques non-ribosomiques, tels que l'ochratoxine A et l'acide cyclopiazonique (Boettger et Hertweck, 2013). En conséquence, les mycotoxines peuvent être classées en quatre grandes catégories : les polycétoacides, les peptides cycliques non-ribosomiques, les terpènes et les hybrides. Les espèces fongiques étant productrices de divers métabolites secondaires présentent les différentes voies de biosynthèses dans leur métabolisme. La Figure 6 présente les différentes origines métaboliques de différentes mycotoxines.

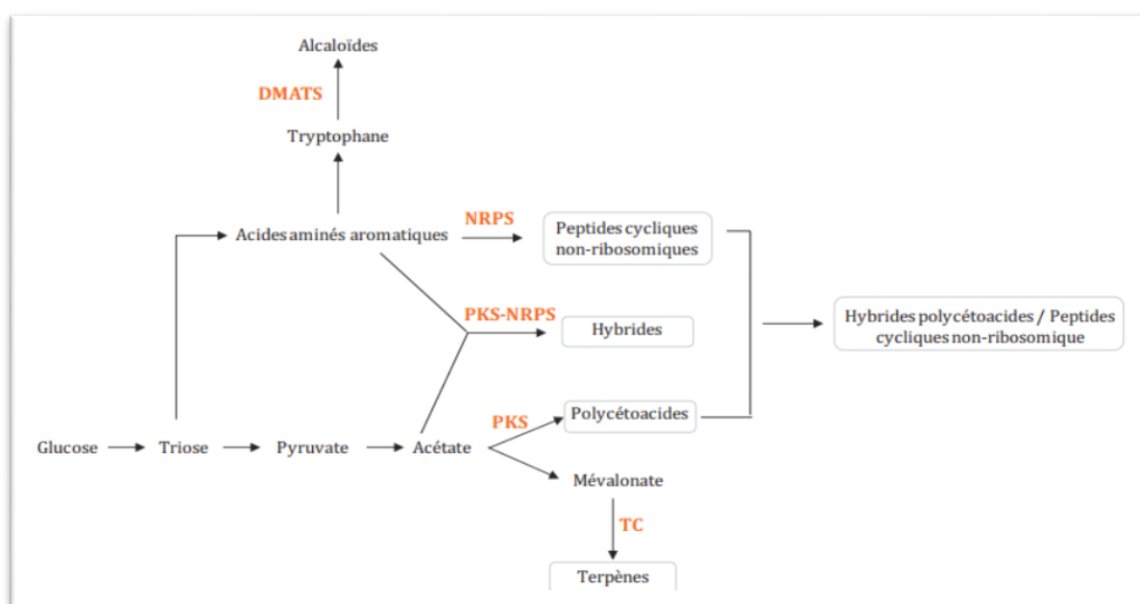


Figure 6 : Origines métaboliques des différentes mycotoxines (Snini, 2014)

Abréviations : NRPS, non-ribosomal peptide synthétase ; PKS, polycétide synthase ; TC, terpènes cyclase ; DMAST, diméthyl ally transférase.

A la différence des toxines bactériennes majoritairement de nature protéique, les mycotoxines sont le produit final d'une cascade de réactions enzymatiques. Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et d'un point de vue moléculaire, toutes les enzymes impliquées fonctionnent au même moment de façon à ce que les nouveaux intermédiaires synthétisés soient pris en charge tour à tour par l'enzyme suivante jusqu'à la synthèse d'un métabolite qui ne sera plus transformé : la mycotoxine. Ce phénomène est rendu possible car les gènes codant pour ces enzymes sont soumis à une co-activation due à l'organisation même de ces gènes en cluster au sein du génome de l'organisme producteur. Ces clusters de gènes sont généralement positionnés dans les régions sub-télomériques des chromosomes qui présentent un haut degré d'hétérochromatine (Keller et Hohn, 1997 ; Palmer et Keller, 2010).

Les moisissures produisent un grand nombre de métabolites secondaires, tels que les mycotoxines et les antibiotiques. La recherche de clusters par l'utilisation d'outils informatiques dans les génomes actuellement séquencés témoigne de la richesse des métabolites secondaires des champignons filamenteux. En 2010, Khaldi et *al.* ont développé un logiciel informatique permettant de prédire la présence de clusters de gènes dans les génomes entièrement séquencés. Le SMURF (Secondary Metabolite Unknown Region Finder), permet actuellement de rechercher la présence de clusters de gènes dans 27 génomes de champignons filamenteux.

Le plus célèbre des clusters de gènes est celui de la voie de biosynthèse des aflatoxines où les 30 gènes le composant ont été caractérisés chez *Aspergillus flavus* et chez *Aspergillus parasiticus* (Yu et *al.*, 1995; Yu et *al.*, 2004; Yu, 2012). Le cluster de la voie de biosynthèse de la stérigmatocystine, un intermédiaire de la production d'aflatoxines, chez *Aspergillus nidulans* partage 16 gènes avec celui de la voie de biosynthèse des aflatoxines mais ces gènes sont organisés différemment (Brown et *al.*, 1996). Le cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des trichothécènes est lui aussi entièrement caractérisé (Kimura et *al.*, 2007). Une partie du cluster de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ochratoxine A a été caractérisée chez *Penicillium nordicum* (Karolewicz et Geisen, 2005) et celui de la voie de biosynthèse des fumonisines a été identifié chez *Fusarium verticillioides* (Seo et *al.*, 2001; Proctor et *al.*, 2003; Bojja et *al.*, 2004; Proctor et *al.*, 2013).

IV. Les moisissures toxinogènes

1. Définition

Les moisissures toxinogènes sont des champignons microscopiques, ubiquistes et hétérotrophes capable de produire des toxines et, nécessitant une source de carbone et une source d'azote pour leur développement. Ils regroupent des milliers d'espèces. Ce sont des microorganismes pluricellulaires constitués de filaments de cellules eucaryotes plus ou moins ramifiés, appelés hyphes. L'ensemble des hyphes constituent le mycélium. Ils sont aussi constitués de quelques cellules plus spécialisées qui produisent des structures de reproduction appelées spores. Les champignons toxinogènes peuvent être classés en deux groupes principaux (CAST, 2003) : les champignons de champ et ceux de stockage.

Les champignons du champ sont des champignons moyennement exigeants en humidité qui produisent des mycotoxines sur des plantes sénescentes ou stressées et contaminent les produits agricoles avant ou pendant la récolte. Ce groupe est représenté principalement par les champignons des genres *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* mais aussi des *Aspergillus* dans le cas des raisins et du maïs.

Les champignons de stockage sont des champignons xérophiles ou xérotolérants qui tendent à produire leurs mycotoxines pendant le stockage tels que ceux des genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*.

2. Principaux genres fongiques

Les genres de moisissures toxinogènes les plus importants sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium*. Ils représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux (légumineuses, graines, oléagineuses, fruits secs, etc) et d'origine animale.

2.1 Le genre *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* appartient à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores non cloisonnés dressés, qui se terminent en vésicules (Figure 7) (Raper et Fennell, 1965).

Ce genre comprend environ 185 espèces réparties morphologiquement en 18 groupes, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton et *al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces du genre *Aspergillus* sont impliquées dans des pathologies animales et humaines. Ils ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002) ; ils se

développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires dont les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994).

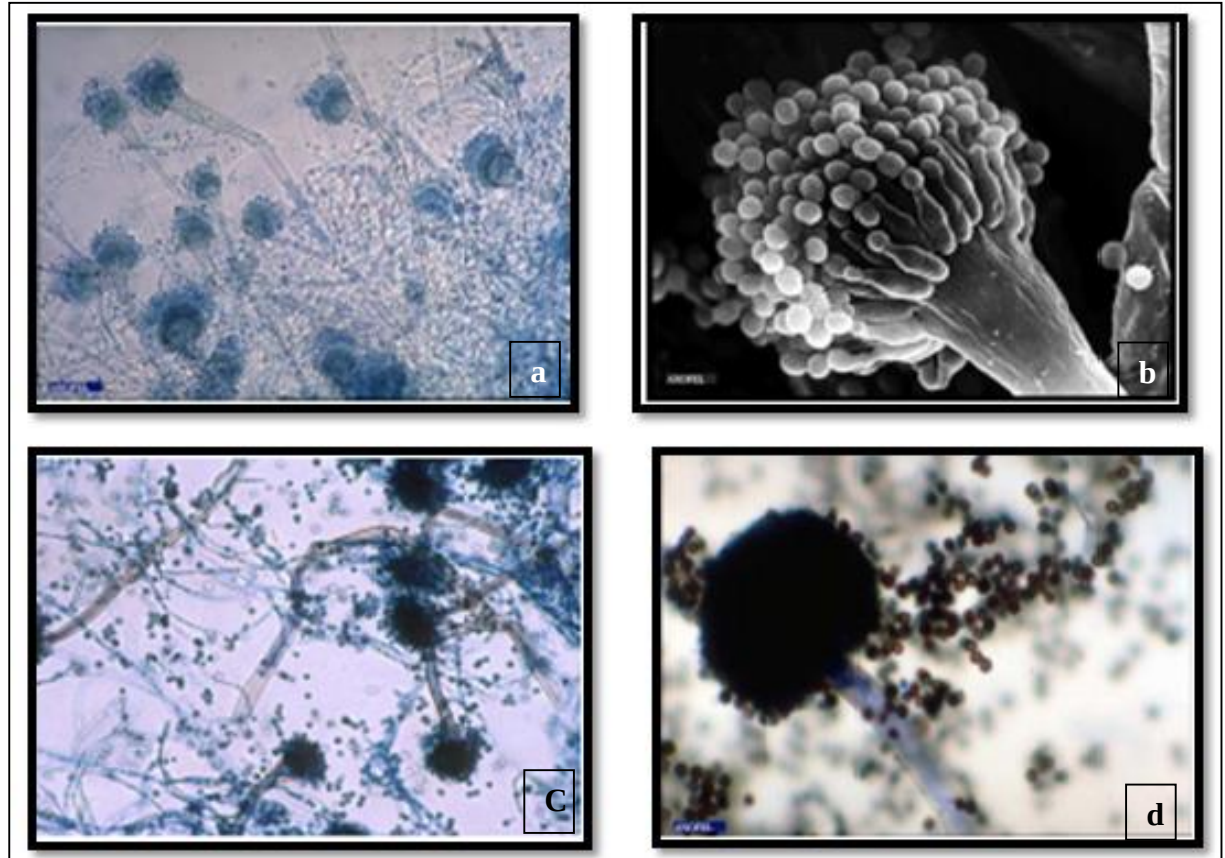


Figure 7 : Quelques espèces du genre *Aspergillus*

a. *A. fumigatus* **b:** *A. fumigatus* en microscopie électronique
c : *A. nidulans* **d:** *A. niger*

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'Homme et les animaux car elles sont capables d'envahir les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses. *Aspergillus fumigatus* est responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* elle, est responsable d'aspergillose du conduit auditif (Morin, 1994). Le tableau 4 représente les principales mycotoxines produites par les moisissures du genre *Aspergillus*.

Tableau 4: Quelques toxines produites par les espèces du genre *Aspergillus*

Espèces	Toxines produites
<i>Aspergillus carneus</i>	Citrinine
<i>Aspergillus clavatus</i>	Patuline
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumigaclavine, Fumagiline, Fumitoxine
<i>Aspergillus niger</i>	Ochratoxines A, Malformine
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ochratoxines, Acide pénicillique
<i>Aspergillus oryzae</i>	Acide cyclopiazonique
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines B1 et B2, G1 et G2
<i>Aspergillus terreus</i>	Citrinine, Patuline
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes telles que les protéases, les xylanases, les glutaminases, la lactase, la cutinase et la lipase, ainsi que certains acides organiques (Botton et *al.*, 1990 ; Sath et *al.*, 2018).

2.2 Le genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* réunit les champignons filamenteux, appartenant au phylum des Ascomycètes. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales. Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, et à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

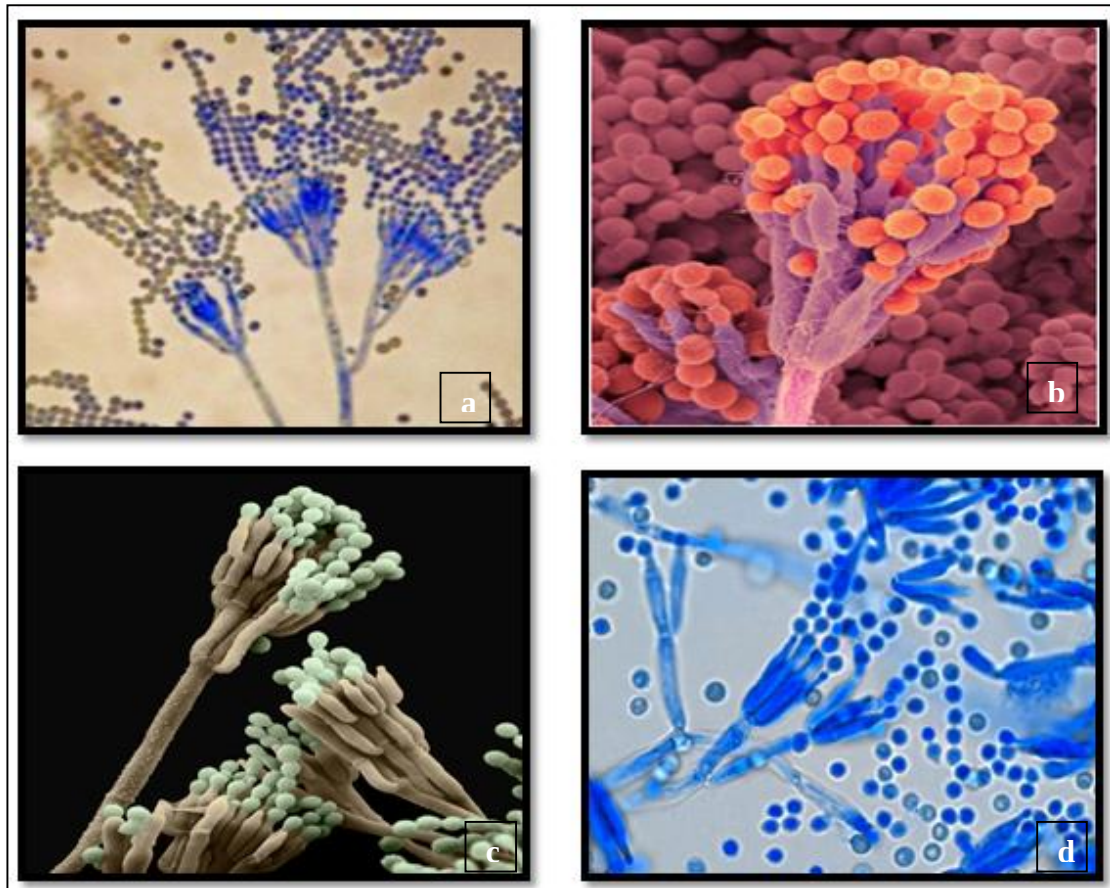


Figure 8 : Quelques espèces du genre *Penicillium*

a : *Penicillium* spp **b.:** *P. notatum* au microscope électronique

c: *Penicillium roqueforti* **d :** *Penicillium citrinum*

Chez l'Homme, les espèces de *Penicillium* étant les moisissures les plus répandues, de nombreuses pathologies leurs sont associées. Elles peuvent être causées par le champignon lui-même ou par les toxines qu'il produit. Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation de spores et s'attaquent le plus souvent aux voies respiratoires supérieures et inférieures. Par ailleurs, les *Penicillia* peuvent être responsables d'inflammation de la cornée (kératomycose), des ongles (onychomycose) et de l'infection de l'oreille externe (Hennequin, 1998). Chez les personnes immunodéprimées, les *Penicillia* sont à l'origine d'infections systémiques touchant les organes profonds comme le foie, la rate, et les ganglions (Rosenthal, 2000). La majorité des espèces de *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines (tableau 5).

Tableau 5: Quelques toxines produites par les espèces du genre *Penicillium* (Pitt, 2000)

Espèces	Toxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Acide cyclopiazonique
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium nordicum</i>	Ochratoxine A
<i>Penicillium roqueforti</i>	Acide pénicillique, Roquefortine C
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinine, Patuline, Roquefortine C
<i>Penicillium viridicatum</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium cyclopium</i>	Ochratoxine A, Citrinine
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinine
<i>Penicillium oxalicum</i>	Roquefortine C, Acide sécalonique D
<i>Penicillium crustosum</i>	Pénitrem A, Roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Acide cyclopiazonique, Patuline, Roquefortine C, griséofulvine

Si certaines espèces de *Penicillium* sont pathogènes, d'autres ont un intérêt industriel. C'est le cas de *Penicillium camemberti* et de *Penicillium roqueforti*, indispensables à la fabrication de certains fromages. Quant à *Penicillium griseofulvum*, il a un intérêt médical car il joue un rôle dans la synthèse d'un antifongique : la griséofulvine. On peut aussi citer *Penicillium notatum*, producteur de la « pénicilline », découverte par Alexander Flemming et qui a permis de donner naissance à des antibiotiques majeurs (amoxicilline, pipéracilline...).

2.3 Le genre *Fusarium*

Les *Fusaria* sont des champignons filamenteux saprophytes appartenant à la classe des Deutéromycètes. C'est un genre qui comprend entre 50 et 100 espèces anamorphes. Le genre *Fusarium* tire son nom du latin « *fusus* » qui signifie fuseau, en référence à la forme des macroconidies (Nelson et *al.*, 1983). Le genre *Fusarium* regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies, les fusarioses chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), les légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers.

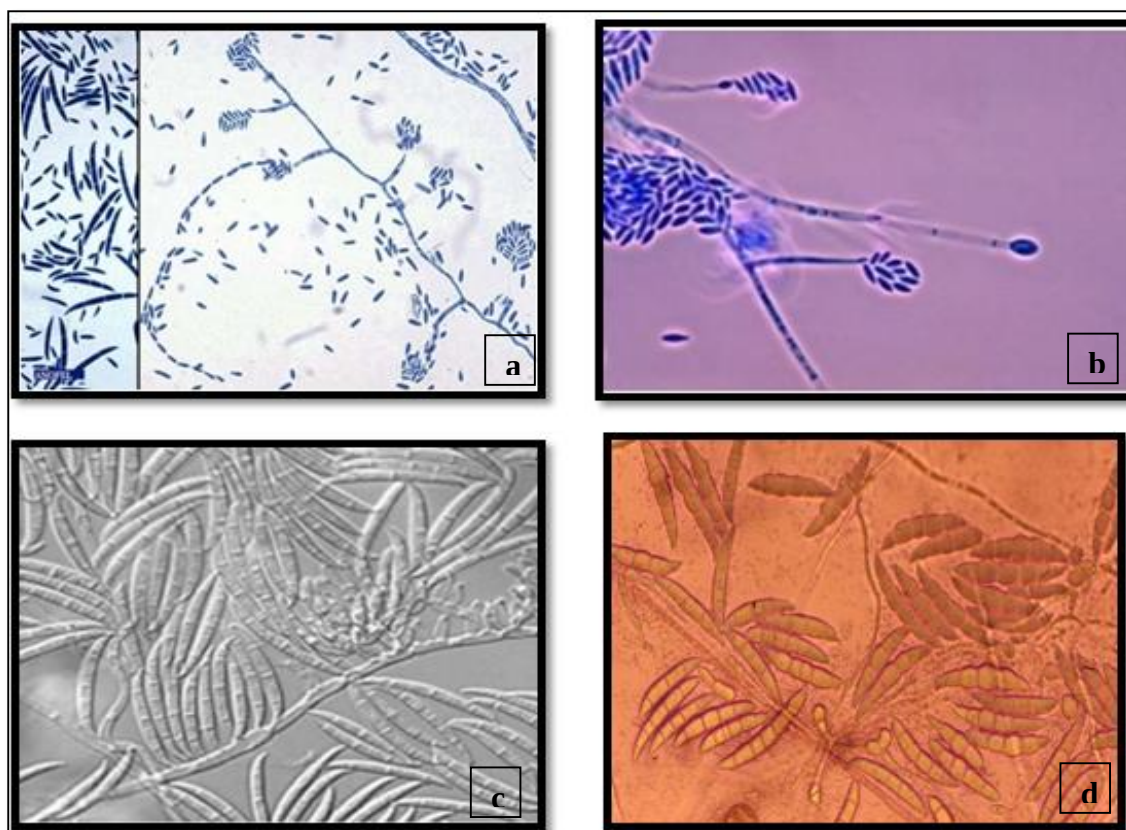


Figure 9 : Quelques espèces du genre *Fusarium*
a : *Fusarium* sp. **b :** *Fusarium verticillioides*
c : *Fusarium graminearum* **d :** *Fusarium roseum*

En dehors de leur capacité à produire des mycotoxines, les *Fusaria* sont susceptibles de provoquer des infections et des intoxications graves chez l'Homme et chez les animaux d'élevage. Ces infections sont réunies sous le terme de fusarioses. Le tableau 6 représente les principales mycotoxines produites par *fusaria*

Tableau 6 : Exemples de toxines produites par les espèces du genre *Fusarium* (Pitt, 2000)

Espèces	Toxines produites
<i>Fusarium culmorum</i>	Trichothécènes B, Zéaralénone, Culmorine, Fusarine C
<i>Fusarium avenaceum</i>	Moniliformine, Fusarine C
<i>Fusarium graminearum</i>	Trichothécènes B, Zéaralénone
<i>Fusarium oxysporum</i>	Acide fusarique, Moniliformine, Oxysporine
<i>Fusarium poae</i>	Trichothécènes A, Fusarine C
<i>Fusarium proliferatum</i>	Moniliformine
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Trichothécènes A, Zéaralénone, Fusarine C
<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisines, Fusarine C, Moniliformine, Naftoquinone, Gibberelines

Chez l'Homme, les effets de *Fusarium spp* sont divers. Quelques espèces sont à l'origine d'infections systémiques (Guarro, 1992), d'autres sont impliquées dans des kératites, des allergies, des mycoses unguéales ou des otomycoses. Les patients immunodéprimés (diabétiques, grands brûlés) sont des cibles privilégiées de ces champignons opportunistes. *Fusarium verticillioides* est responsable de fusarioses disséminées chez les personnes atteintes par le VIH (Duran, 1989).

3. Conditions de toxinogénèse

Les mycotoxines sont élaborées lors de la prolifération de moisissures (Samson et *al.*, 2007). La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique jouent un rôle dans la toxinogénèse. De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée.

Les fourrages et les céréales sont naturellement en contact avec des spores fongiques qui se trouvent à l'état latent dans l'environnement et notamment dans les sols : c'est une contamination tellurique naturelle (Bastiaanse, 2002). Les facteurs qui favorisent cette contamination sont : l'activité en eau, la température, l'acidité du milieu, la teneur en oxygène, la composition du substrat et la microflore.

3.1 La disponibilité en eau ou l'activité de l'eau (aw)

L'activité de l'eau, symbolisée par le sigle aw (pour *activity of water*), est définie comme le rapport de la pression de vapeur d'eau d'un produit (p) sur la pression de vapeur de l'eau saturante (p_0), à une température donnée (Tabuc, 2007). En pratique, l'activité de l'eau reflète la quantité d'eau disponible dans une substance liquide ou solide. Elle reflète la quantité d'eau « libre », indispensable aux réactions biochimiques d'un micro-organisme. L'aw permet de donner des informations importantes sur la stabilité physico-chimique d'un produit et sur son innocuité microbiologique. La valeur de l'activité de l'eau s'établit de 0 à 1. Plus l'aw est grande, plus la quantité d'eau disponible pour la croissance d'un micro-organisme est importante. En général l'aw nécessaire à la toxinogénèse est supérieure à celle permettant la croissance fongique (Pfohl-Leszcwicz, 2001). Par exemple, *Penicillium verrucosum* peut se développer à partir d'une aw de 0,80 ; alors que la production d'OTA n'est possible que lorsque l'aw est $\geq 0,85$ (Cairns-Fuller et *al.*, 2005). De même, *Fusarium graminearum* peut se développer dans des substrats dont l'activité hydrique est de l'ordre de 0,93. Alors que la production de déoxynivalénol, est importante pour des aw de 0,995 ou plus (Ramirez et *al.*, 2006).

3.2 La température

La température joue un rôle prépondérant dans le développement, la reproduction et la toxinogénèse des moisissures. La température optimale pour l'élaboration de mycotoxines est le plus souvent inférieure à la température optimale de croissance, (Pfohl Leszkowicz, 2001).

La température optimale pour la croissance de *Fusarium graminearum* est de 25°C, mais la synthèse de la zéaralénone peut avoir lieu à 15°C. La température peut aussi influencer la proportion de toxines produites par une souche susceptible de synthétiser plusieurs molécules. Par exemple, *Fusarium graminearum* peut produire préférentiellement de la zéaralénone à 25°C, alors qu'à 28°C c'est le déoxynivalenol (DON) qui est majoritairement produit (Pfohl-Leszkowicz, 2001). Barrios et al. (1996) ont rapporté que des conditions cycliques de température (5°C et 25 °C) sont encore plus favorables à l'aflatoxinogénèse par *A. parasiticus* qu'une température constante de 25 °C. La sporulation est aussi stimulée par de telles conditions, on peut penser que ce phénomène serait une réponse à un stress physiologique. Enfin, Marin et al. (1995) ont étudié l'influence de l'aw et de la température sur la production des fumonisines par *F. proliferatum* et *F. moniliforme*. La quantité de toxines augmente avec l'aw aussi bien à 25 °C qu'à 30°C.

3.3 L'acidité du milieu

Il existe des pH pour lesquels la croissance fongique est optimale. Généralement ces valeurs de pH se situeraient entre 5 et 6 (Tabuc, 2007). C'est le cas pour la moisissure *Fusarium proliferatum* dont la croissance optimale est à pH de 5,6 (Keller et al., 1997).

La gamme de pH permettant la toxinogénèse est plus restreinte que celle permettant la croissance fongique. Keller et al. (1997) ont étudié l'effet du pH sur la production de fumonisine B1 par *F. proliferatum* dans un milieu liquide limité en azote. Ils ont déduit qu'il existe un seuil qui sépare deux comportements physiologiques différents. Au dessus d'un pH de 5, *F. proliferatum* se développe normalement et produit peu de toxine alors qu'à des pH inférieurs à 5 la croissance est moins importante mais la production de toxine est plus grande. Par ailleurs en dessous de pH de 2,5 la croissance et la toxinogénèse sont inhibées.

3.4 La teneur en oxygène du milieu

La production des mycotoxines est plus sensible à la variation de composition de l'air que la croissance fongique. Une concentration en O₂ inférieure à 1% et des concentrations élevées de CO₂ empêchent l'élaboration de mycotoxines (Keller et al., 1997 ; Cairns-Fuller et al., 2005).

3.5 La composition du substrat

La composition qualitative et quantitative des substances nutritives, principalement les glucides peut influencer la production de mycotoxines. Par ailleurs, l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* alors que la proline stimule cette production. De même, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus* (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

3.6 La microflore

La présence d'autres moisissures agit doublement sur l'accumulation de toxines. En terme d'écologie, il y a une compétition pour les substrats. Seules les souches les plus compétitives et possédant un vaste spectre de substrats métabolisables se développeront. Aussi, certaines souches peuvent dégrader des mycotoxines. Un effet inhibiteur de la mycoflore spontanée a aussi été démontré par O'Neill et al. (1996). Ayant analysé la production de trichotécènes et de zéaralénone par *F. culmorum* sur du maïs, ces auteurs se sont aperçus que sur les grains stérilisés par la chaleur ou par l'irradiation, la quantité de mycotoxines est supérieure à celle présente dans des grains non-stérilisés. Ceci est dû au fait que dans le premier cas, le substrat est exempt de microorganismes alors que la flore spontanée est présente dans le second cas. Cependant, Marin et al. (1998) ont étudié l'influence d'une flore compétitive sur la croissance et la production de fumonisine par *F. moniliforme* et *F. proliferatum*. A 15 et 25°C et à une aw de 0.98, la colonisation du milieu par les deux *Fusarium* est plus faible avec *A. flavus*, et *A. ochraceus* en même temps, la production de fumonisine est stimulée par ces deux moisissures. Les bactéries ont aussi une influence sur la mycotoxinogénèse. Ainsi, Barrios et al. (1996) rapportent que l'inoculation de bactéries lactiques trois jours avant celle d'*A. parasiticus* provoque une diminution de la croissance et de la production de toxines. Ce phénomène serait dû au pH et à l'effet de compétition pour le substrat.

V. Mycotoxines dans les denrées alimentaires marocaines

La position géographique du Maroc, point de carrefour entre l'océan Atlantique et la mer Méditerranéenne, lui confère un climat chaud et humide favorisant la croissance des moisissures dans les zones côtières abritant environ 70% de la population totale. Ces conditions climatiques sont probablement favorables pour la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. Au Maroc, plusieurs études ont été réalisées sur la recherche des mycotoxines dans des denrées alimentaires.

1. Les mycotoxines dans les céréales et dérivés

Les céréales occupent une importance sociale, économique et nutritionnelle pour la population mondiale. Le Maroc importe ses besoins en céréales de différents pays notamment la France, les USA, le Canada, le Brésil, la Russie et l'Australie. Selon la FAO, 25% des céréales commercialisées à l'échelle internationale sont contaminées par des mycotoxines. Dès les années 70, les premières investigations faites par Tantaoui-Elaraki, (1977) ont montré que 30 échantillons de céréales marocaines (blé dur, blé tendre, orge et maïs) et de produits dérivés (pain de blé, pain d'orge, semoule de blé, pâtes et couscous), se sont révélés susceptibles d'héberger des spores d'*Aspergillus* toxinogènes. La recherche de l'OTA dans 100 échantillons de pain commercialisés dans cinq villes différentes Casablanca, Rabat, salé, Témara et Méknès a révélé un fort pourcentage de contamination de l'ordre de 48%. Parmi 17 échantillons de blé marocain analysés par Hajjaji et *al.* (2006), 41% se sont avérés contaminés par le DON. Une autre étude menée par Zinedine et *al.* (2006) a montré la présence du FB1 dans 50% des échantillons de maïs analysés avec une valeur de contamination moyenne de 1 930 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ avec un maximum de 5 960 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ tandis que le ZEA a été trouvé dans 15% des échantillons (moyenne 14 et maximale 17 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

En 2016, Bouafifssa et *al.* ont étudié la présence multiple de 20 mycotoxines (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ENN A, ENN A1, ENN B, ENN B1, BEA, FB1, FB2, FB3, ZEA, NIV, DON; 15-acetyldeoxivalenol (15-ADON), 3-acétyldésoxivalénol (3-ADON), fusarénone X, T-2 et HT-2) dans les pâtes consommées au Maroc. Les résultats obtenus montrent que 51% des échantillons analysés étaient positifs pour la ZEA, et plus de 50% des échantillons étaient positifs pour le DON et le HT-2, avec des concentrations dépassant les niveaux maximaux autorisées par les normes marocaines (2016). Plus récemment, Zinedine et *al.* (2017) ont étudié la contamination de la semoule de couscous par plusieurs mycotoxines dans diverses régions du Maroc. Une centaine d'échantillons (86 blé, 8 orge et 6 maïs) de couscous ont été analysés et ont révélé la présence de 22 mycotoxines produites par les moisissures de genre *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (15-ADON, 3-ADON, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, BEA, DON, diacétoxyscirpénol, ENN A, ENN A1, ENN B, ENN B1, FB1, FB2, FB3, T-2, HT-2, NIV, OTA, STE et ZEA). La cooccurrence de mycotoxines dans les échantillons de semoule de couscous était fréquente et 96 % des échantillons étaient contaminés par au moins une mycotoxine. Les enniatines (ENN B, ENN B1 et ENN A1) et ZEA ont montré l'incidence la plus élevée.

Au Maroc, plusieurs études se sont intéressées à la contamination de l'alimentation animale par l'AFB1 et OTA. L'aliment de volaille était le plus étudié, l'AFB1 été présent dans 10% des échantillons analysés, avec des concentrations allant de 1 à 5625 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Kichou et Walser, 1993; Tantaoui-Elaraki et *al.*, (2000); Benkerroum et Tantaoui-Elaraki, (2001); Zinedine et *al.*, (2007b)). Sifou et *al.* (2016) ont également montré la présence d'OTA dans 31% des échantillons de l'aliment de volaille analysés, avec des concentrations allant de 0.24 à 26.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

2. Les mycotoxines dans les fruits secs

La présence d'OTA dans les fruits secs et les noix du Maroc a été étudiée par Zinedine et *al.* (2007c). Ces auteurs ont rapporté que l'incidence d'OTA dans les raisins secs, les figues sèches, les noix et les arachides était respectivement de 30%, 65%, 35% et 25%, tandis que les échantillons de pistaches étaient exempts d'OTA. Les concentrations moyennes de l'OTA dans les échantillons positifs d'arachide, de figues sèches, de raisins secs et de noix étaient respectivement de 0,68, 0,33, 0,96 et 0,11 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

3. Les mycotoxines dans les épices

Les épices sont appréciées pour leurs arômes distinctifs et leurs couleurs. Elles sont parmi les ingrédients les plus polyvalents et les plus largement utilisés dans la préparation des aliments dans le monde entier. Et comme d'autres produits agricoles, elles sont exposées à un large éventail de contaminations au cours de pré et post récolte. Une telle contamination peut se produire pendant le stockage, la distribution, la vente ou l'utilisation (Hashem et Alamri, 2010).

Zinedine et *al.* (2006) ont recherché les AFs dans 55 échantillons d'épices marocaines, dont 14 de paprika, 12 de gingembre, 14 de cumin et 15 de poivre noir. La prévalence des AFs était très élevée. 100% dans le paprika, 93% dans le poivre noir, 86% dans le gingembre et 57% dans le cumin. Les concentrations les plus élevées ont été observées dans le gingembre (9,10 μg d'AF total /kg) et le paprika (9,68 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Dans une autre étude réalisée par Houmairi et Hicham (2015), sur 20 échantillons d'épices, l'incidence de la contamination par les AFs était de 80% et la concentration maximale a été observée dans le paprika (10,37 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) suivi par le piment (1,74 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), cumin (1,08 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), curcuma (1,01 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), gingembre (0,45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), coriandre (0,26 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) et cannelle (0,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Le poivron avait la concentration maximale en AF (10,37 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). Pour l'OTA, l'incidence de la contamination était de 100% pour les quatre épices analysées, à savoir le poivre noir, le piment, le curcuma et le cumin. Les niveaux d'OTA dans ces épices étaient respectivement de 147,33, 25,95, 4,37 et 0,46 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

VI. Méthodes de réduction du taux de mycotoxines dans les aliments

1. Elimination des mycotoxines

Dans certaines conditions, notamment climatiques et avec tous les efforts possibles, la contamination des aliments par les mycotoxines est inévitable. Cependant, il est parfois possible de faire une décontamination. Cette dernière consiste à réduire, détruire voire supprimer les effets toxiques des mycotoxines. La réduction du taux de mycotoxines peut s'effectuer pendant le procédé de fabrication de l'aliment (Bullerman et Bianchini, 2007) ou par l'ajout d'additifs dans l'aliment qui éliminent ou désactivent les mycotoxines dans l'organisme. Ceci ne doit pas générer de résidus toxiques, doit maintenir la qualité nutritive de l'aliment sans modifier les propriétés organoleptiques du produit. Les méthodes de détoxification sont classées en trois groupes (Quillien, 2002) : les méthodes chimiques, physiques et les adsorbants.

2. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques regroupent tous les traitements utilisés après la récolte visant à détruire ou désactiver les mycotoxines. On trouve divers agents comme les acides tels que l'acide citrique et les bases comme la soude ou l'ammoniaque, les agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène ou l'ozone, les agents réducteurs comme les bisulfites, les agents chlorés, le formaldéhyde Ces méthodes chimiques sont utilisées surtout contre les aflatoxines (Furukawa et Sakuda, 2019). Cependant, l'utilisation de ces agents est controversée (Quillien, 2002).

3. Méthodes physiques

Parmi les méthodes physiques, on trouve des techniques très diverses allant du simple tri et élimination des grains contaminés (exemple : élimination des grains ergotés qui flottent dans une solution saline) jusqu'aux méthodes plus drastiques comme l'utilisation d'inactivation thermique à haute température, l'irradiation par les rayons UV ou les rayons X (Yiannikouris, 2002 ; Jiang *et al.*, 2018). Ces dernières techniques ont toutes pour but de modifier la structure chimique des toxines.

4. Adsorption

L'adsorption est une technique qui consiste à incorporer des agents adsorbants dans les rations alimentaires des animaux, suspectées d'être contaminées. Ce sont des composés inertes d'un point de vue nutritionnel et chimique. Ils agissent en fixant et en séquestrant les mycotoxines dans la lumière intestinale, réduisant par conséquent leur biodisponibilité. Ils

sont surtout utilisés dans l'alimentation des bovins, des porcins et de la volaille. Les adsorbants sont de deux types : minéraux et biologiques.

4.1 Les adsorbants minéraux

Quand les mycotoxines sont présentes dans les aliments, leur immobilisation par liaison non covalente à des adsorbants constitue une méthode de décontamination de plus en plus utilisée. Cette technique se révèle très performante pour certaines toxines. Parmi ces adsorbants minéraux : le charbon activé, les silicates et une argile, la Bentonite.

4.1.1 Le charbon actif

Le charbon activé est une poudre noire non hydrosoluble obtenue par pyrolyse de différents types de matières organiques. Il est très poreux. En milieu aqueux, il peut adsorber la plupart des mycotoxines. Le charbon activé a surtout été étudié pour adsorber l'AFB1, la ZEA et le DON car ce sont les mycotoxines pour lesquelles peu d'alternatives efficaces existent (Guerre, 2000 ; De Mil et *al.*, 2015). La persistance d'une coloration brunâtre dans les produits traités par le charbon rend toutefois difficile leur utilisation.

4.1.2 Les silicates

Cette famille de ligands est composée de plusieurs groupes et de nombreuses molécules dont le plus étudié est le HSCAS (aluminosilicate de sodium calcium hydraté). Selon Whitlow et *al.* (2007), le HSCAS est un mauvais absorbant pour les autres mycotoxines. Cette molécule est cependant caractérisée par son fort potentiel d'adsorption pour les aflatoxines de façon presque spécifique. Ces composés font partie de la famille des zéolites, ayant un déficit en charge positive. Plus de 200 ppb d'AFB1 peuvent être fixées par mg d'HSCAS (Phillips, 1990). Cette forte fixation explique que seules de faibles quantités d'HSCAS soient nécessaires dans les aliments pour diminuer les effets délétères des aflatoxines (0,1 à 0,5 %). Cet effet protecteur a été observé par Harvey (1994) ; Abo-Norag (1995) et Liu et *al.*, (2018) chez le poulet, la dinde et le cochon. Cet effet est accompagné d'une diminution des teneurs en aflatoxine M1 dans le lait des ruminants (Harvey, 1991 ; Smith, 1994 ; Naeimipour et *al.*, 2018).

4.1.3 La bentonite

La bentonite est une argile de type « montmorillonite », formée par le vieillissement de cendres volcaniques. Le terme de bentonite regroupe donc différents produits de même origine mais de compositions différentes. Composées d'aluminium et de silice, elles font également partie de la grande catégorie des aluminosilicates.

La bentonite de sodium est la plus courante et la plus utilisée en alimentation animale. En raison de sa grande surface interne, ce composé adsorbe environ 6 à 7 fois son poids en eau. Ses propriétés adsorbantes vis-à-vis des aflatoxines ont été explorées : *in vitro*, la bentonite adsorbe 70 à 100 % de l'AFB1 (Avantaggiato et al., 2005 ; Kong et al., 2014 ; Bočarov-Stančić et al., 2018). Les capacités adsorbantes varient selon la nature de la bentonite utilisée (Ramos, 1999). *In vivo*, l'ajout de bentonite de sodium à des aliments contaminés par les aflatoxines diminue leur toxicité chez les porcs et les volailles (Bhatti et al., 2018).

4.2 Adsorbants biologiques (encore appelés ligands organiques)

De nombreuses études ont porté ces dernières années sur les adsorbants de nature biologique, cherchant à obtenir une bonne efficacité et une meilleure spécificité d'adsorption tout en diminuant l'impact sur la qualité nutritionnelle des aliments par rapport aux adsorbants minéraux. C'est le cas notamment des parois des levures et des bactéries lactiques (Jard, 2009).

4.2.1 Les levures ou produits dérivés de levures

4.2.1.1 Composition et efficacité de la paroi cellulaire des levures

Les inconvénients des adsorbants minéraux ont poussé les scientifiques à explorer d'autres méthodes. Des souches entières de levures, tels que *Saccharomyces cerevisiae*, ou d'autres types de levures œnologiques ont la capacité d'adsorber les mycotoxines avec une efficacité variable. Les parois des levures sont capables de se lier aux mycotoxines et de limiter ainsi leur biodisponibilité dans le tube digestif. Trois composants principaux constituent la paroi des levures : les glucanes, les mannanes et la chitine. La surface extérieure de la paroi cellulaire des levures est composée d'un mélange complexe d'hydrates de carbone qui contient du mannose et un mélange de mannose protéines. Les surfaces intérieures contiennent des glucanes et autres glucides complexes.

Les éléments responsables de l'adsorption sont les glucomannanes. Extraits de parois de levures, ils ont été testés séparément *in vitro* et *in vivo* (Jouany, 2007). Contrairement aux argiles, ils peuvent être ajoutés à faibles doses et sont biodégradables. Cependant, les recherches effectuées chez les porcs concernant leur efficacité dans l'atténuation des effets de mycotoxines *in vivo* reste limitées et donnent des résultats contradictoires (Swamy et al., 2002 ; Diaz-Llano et Smith, 2006).

Selon les travaux de Raju et Devegowda (2000) ; Swamy et al. (2002) et Mohaghegh et al., (2017) les glucomannanes peuvent également réduire les effets néfastes des AFs, de l'OTA et de la toxine T-2 chez les poulets de chair en améliorant les performances de croissance et la prise

alimentaire, diminuant le poids du foie et le poids des glandes surrénales et en augmentant les concentrations des protéines sériques, des hémoglobines et du cholestérol.

4.2.1.2 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont en général des micro-organismes à Gram positifs, immobiles, asporulés, anaérobies ou aérobies. Certaines souches de bactéries lactiques et des genres *Propionibacterium* et *Bifidobacterium* sont capables de se lier aux mycotoxines. Selon Peltonen et al., (2001), l'efficacité d'adsorption dépend des souches étudiées. La liaison entre les mycotoxines et les bactéries lactiques semble être due à des polycarbonates, qui provoquent des liaisons hydrophobes, et à la capacité des parois cellulaires bactériennes à lier des cations, en particulier des cations divalents (Haskard et al., 2000 ; El-Nezami et al., 2004). Les bactéries lactiques du lben marocain (produit laitier de fermentation mésophile) et du yaourt (fermentation thermophile) ont été testées sur l'évolution de la teneur en aflatoxine M1 ajoutée artificiellement au lait à 5 µg.l⁻¹. Les bactéries thermophiles n'entraînent qu'une faible élimination de l'aflatoxine M1 (19 % pour *Lactobacillus bulgaricus*, 10% pour *Streptococcus thermophilus* et 8% pour les deux souches combinées). Les bactéries mésophiles permettent une destruction de l'aflatoxine M1 totale pour *L. lactis* en culture pure ou combiné avec *Lactococcus diacetylactis*. Pour cette dernière souche, la destruction est importante (58 %), même si elle n'est pas totale (Khaddor et al., 2003). Juodeikiene et al., (2018) ont mené une étude sur l'élimination des mycotoxines contenues dans les grains de blé par les bactéries lactiques (*Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus*). Le taux de réduction de ZEN, DON, T-2 et HT-2 par ces bactéries était respectivement de 23, 34, 58 et 73%.

VII. Réglementation des mycotoxines

1. A l'échelle internationale

Depuis la découverte des AFs en 1960, des règlements ont été mis en place dans de nombreux pays pour protéger les consommateurs contre les effets nocifs des mycotoxines qui peuvent contaminer les denrées alimentaires, et assurer des pratiques loyales dans le commerce alimentaire. Les limites maximales sont établies par la Commission de réglementation de l'Union européenne (EC, 2006), les Etats Unis « Food and Drug Administration » (FDA, 2005) ainsi que le JECFA (comité international d'experts scientifiques administré conjointement par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'OMS qui élabore les recommandations au niveau du codex alimentarius (FAO, 2004). En effet, l'Union européenne dispose de la législation la plus complète à l'échelle internationale, dans le cadre

de la réglementation des denrées destinées à l'alimentation humaine et animale et même pour le lait et les aliments infantiles. Au Maroc, ce n'est qu'en 2016 que la loi fixant les limites maximales des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale est entrée en vigueur (Bulletin officiel, 2016). La réglementation concernant les quantités maximales admissibles en mycotoxines varie d'un pays à l'autre, d'un produit alimentaire à l'autre et d'une mycotoxine à l'autre. Les teneurs maximales des mycotoxines établies par la Commission de réglementation de l'Union européenne (EC, 2016) dans les denrées alimentaires.

2. A l'échelle nationale

Au Maroc, en mars 2016, un arrêté conjoint du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime et du ministre de la santé a été publié sur les limites maximales autorisées de plusieurs mycotoxines dans une grande variété de produits alimentaires. Ces limites maximales ainsi que les seuils d'alerte cités dans cet arrêté s'appliquent à la partie comestible du produit concerné pour l'ensemble des produits primaires et des produits alimentaires. Les limites pour les mycotoxines sont similaires à celles adoptées par l'Union européenne (CE, 2006, 2010, 2016). Pour toutes les mycotoxines (AF, OTA, DON, ZEA, FB1, FB2 et PAT), les limites maximales sont strictement identiques à celles de l'Union Européenne.

Présentation du travail

L'objectif du présent travail est :

Dans une première partie :

- ✓ Evaluer la fixation des aflatoxines et des ochratoxines par le NP1600® (Natural Promotor, un produit mis au point dans notre laboratoire, homologué et autorisé par l'ONSSA depuis 2013) et son effet sera comparé à celui de Mycofix® : approche *in vitro*.
- ✓ Evaluer *in situ* de l'action du Mycofix®, du NP1600® et des argiles marocaines sur la production des mycotoxines (les aflatoxines, les fumonisines, la toxine T-2 et la DON) et le développement des moisissures dans la farine de maïs après 8 mois de stockage.

Dans une deuxième partie :

- ✓ Tester l'effet du NP1600® et du Mycofix® *in vivo* dans la prophylaxie de l'ochratoxicose chez le poulet de chair. Cette étude vise à :
 - Isoler et identifier les moisissures des grains de maïs contaminés naturellement ;
 - Evaluer le pouvoir toxigène des souches isolées et leur capacité à produire les ochratoxines ;
 - Etudier les effets du NP1600® ou du Mycofix® sur : Les performances zootechniques des poulets de chair et le taux d'accumulation des ochratoxines dans le foie et les reins de ces poulets.
- ✓ Évaluer l'efficacité *in vivo* chez les poulets de chair, du NP1600® et du Mycofix® dans la prophylaxie de la mycotoxicose. Cette étude vise à étudier les effets de ces deux produits sur :
 - Les performances zootechniques des poulets de chair,
 - Le taux d'accumulation des ochratoxines dans les foies et les reins des poulets
 - Les paramètres biochimiques du sang.

Partie I : Evaluation *in vitro* de l'adsorption des mycotoxines

Chapitre I : Evaluation de la fixation des aflatoxines et des ochratoxines par le NP1600® : Approche *in vitro*

I. Introduction

Connues depuis des années, les mycotoxines sont des toxines naturelles produites par des moisissures. Elles peuvent contaminer une large gamme de denrées alimentaires, des matières premières aux produits transformés. Leurs effets toxiques sur l'Homme et l'animal sont multiples et bien établis. Leur stabilité et leur présence sur de nombreux produits agricoles justifient l'attention croissante qui leur est portée.

Le contrôle du niveau de contamination des aliments exige l'emploi de stratégies variées et complémentaires et ce, à différentes étapes de l'élaboration de l'aliment. Des méthodes préventives telles que des pratiques culturales adaptées existent pour diminuer le risque de prolifération de moisissures. Cependant, l'élimination totale du risque fongique et mycotoxique est impossible (CAST, 2003).

Une façon d'assurer la qualité sanitaire des aliments est l'utilisation de ligands minéraux et organiques ou de micro-organismes capables de fixer les mycotoxines afin de limiter leur absorption dans l'organisme de l'animal. Ceci permettrait de contrecarrer les effets néfastes des mycotoxines. De nombreuses études ont été effectuées dans ce domaine mais peu d'entre elles ont des applications dotées de faisabilité technique et économique.

Dans notre étude, deux familles de mycotoxines ont été étudiées. Ces mycotoxines sont produites au cours du stockage par *Aspergillus* et *Penicillium* comme les aflatoxines (AFs) et les ochratoxines.

L'objectif de cette première partie du travail était d'évaluer *in vitro* l'efficacité d'adsorption de divers agents séquestrants de mycotoxines, dans des conditions de durée, de température et de pH proches d'un système digestif animal.

II. Matériel et méthodes

1. Les agents adsorbants

Cette étude *in vitro* a été réalisée pour comparer l'efficacité de détoxification des ochratoxines et des aflatoxines totales par plusieurs substances adsorbantes commerciales qui sont le Mycofix[®], le Calibrin A, le Calibrin Z, le NP1600[®], la bentonite A, la bentonite B et la stévensite.

Tableau 7: Composition et mode d'action supposé des sept adsorbants testés

Produit	Composition	Mode d'action supposé	Origine
Mycofix[®]	Un adsorbant et un mélange enzymatique	Adsorption des mycotoxines polaires et dégradation enzymatique des tricothécènes et de la ZEA.	Biomin GmbH, Herzogenburg, Autriche
Calibrin A	Une argile montmorillonite	Adsorption des mycotoxines hydrophobes	Amlan International, USA
Calibrin Z	Une argile montmorillonite calcium	Adsorption des mycotoxines hydrophobes (la zéaralénone)	Amlan International, USA
NP1600[®]	Un mélange d'argiles marocaines et d'huiles essentielles.	Adsorption	LIAV (Laboratoire Industriel d'Alternatives Vétérinaires, Fès Maroc).
Bentonite A	Argile marocaine	Adsorption	LIAV, Fès, Maroc
Bentonite B	Argile marocaine	Adsorption	LIAV, Fès, Maroc
Stévensite	Argile marocaine	Adsorption	LIAV, Fès, Maroc

2. Préparation des mycotoxines

Les solutions standards des ochratoxines (A, B) et des aflatoxines totales (B1, B2, G1 et G2) sont fournis par Romer Labs Diagnostic GmbH, Tulln, Autriche. Ces solutions ont été diluées respectivement à 37 fois et 10 fois dans l'eau distillée. Les gammes de quantification des kits ELISA utilisées pour l'analyse des ochratoxines et des aflatoxines totales étaient respectivement de 2 à 40 et 1 à 20 ng.ml⁻¹.

3. Protocole d'adsorption *in vitro* mimant les conditions d'un système digestif

L'efficacité de l'adsorption de différentes mycotoxines par les adsorbants a été testée dans un mime de système digestif *in vitro* (Figure 10) selon la méthode de Kong, (2014).

Dans des tubes coniques de 50 ml contenant 2,5 ml du tampon phosphate (0,1 M, pH 6,0), une quantité de 5 ml de chaque solution de mycotoxine est mise en contact avec 25 mg d'adsorbant. Le pH est ensuite ajusté à pH 2 par l'addition de 300 μ l d'HCl (1M). Ensuite chaque échantillon est incubé sous agitation pendant 2 h à 39° C.

Après cette période d'incubation, simulant les conditions au niveau gastrique, 1 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,8) a été ajouté à chaque tube conique. Puis le pH est ajusté à 6,8 par l'ajout de 300 μ l de NaOH (1M). Les tubes sont à nouveau incubés pendant 4h. Cette dernière étape simule les conditions dans l'intestin. Après 4h d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 2100 *g* pendant 10 min. Le surnageant est utilisé pour l'analyse des mycotoxines. Pour chaque adsorbant 3 répétitions ont été réalisées. La quantité de chaque mycotoxine restante dans le surnageant est mesurée par la technique d'ELISA par compétition directe.

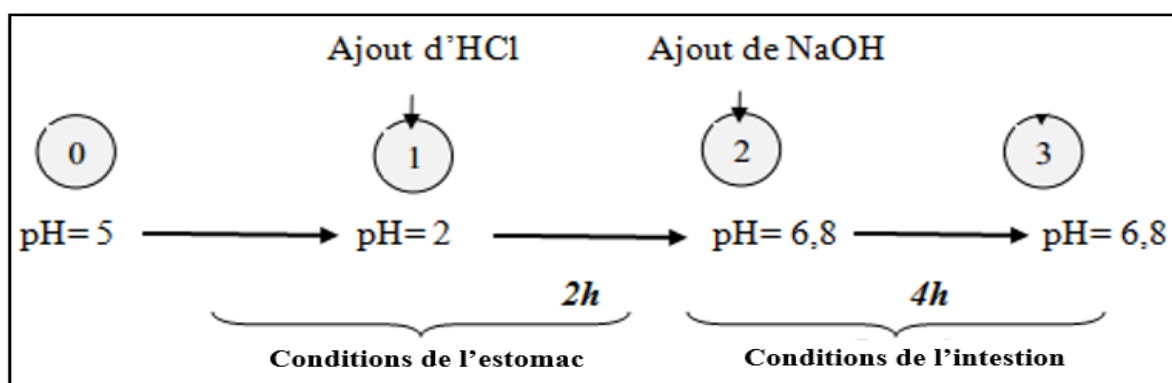


Figure 10 : Protocole utilisé pour mimer l'adsorption dans des conditions de pH, de température et de temps de séjour dans un système digestif de porc (Kong et al., 2014).

4. Dosage des mycotoxines par la technique d'ELISA par compétition directe

4.1 Principe de la technique immuno-enzymatique ELISA

La **méthode immuno-enzymatique ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) qui correspond à un dosage immuno-enzymatique sur support solide, est un examen courant de laboratoire. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon.

L'ELISA est une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps. L'un de ceux-ci est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit avec les complexes antigène-anticorps et est couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire, qui doit son nom à la technique, permet, en présence d'un substrat chromogène, l'émission d'un signal par la production d'un produit coloré. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la concentration de l'anticorps dans l'échantillon.

4.2 Principe du kit ELISA

Le kit AgraQuant[®] mycotoxines est un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en phase solide à compétition directe. Il sert à déterminer le niveau quantitatif des mycotoxines et qui repose sur le principe d'une réaction entre antigène (molécule à doser) et anticorps pour former un complexe antigène – anticorps.

Le test est réalisé sur une plaque de microtitration recouverte avec des anticorps antimycotoxine, ce qui constitue la phase solide. Les standards ou les échantillons et l'enzyme conjuguée mycotoxine-peroxydase sont ajoutés à chaque puits. Lors de la première incubation, il y a une compétition entre la mycotoxine libre contenue dans l'échantillon ou le standard et la mycotoxine conjuguée à l'enzyme pour les sites de liaison aux anticorps anti-mycotoxine (figure 11). Suite à cette première incubation, les molécules non liées sont éliminées par lavage. L'enzyme conjuguée qui est liée à la phase solide est révélée par addition d'une quantité donnée de substrat chromogénique. L'enzyme convertit le chromogène incolore en un produit bleu. L'addition d'un réactif "stop" permet la conversion de la couleur bleue en jaune. L'absorbance est ensuite mesurée par un spectrophotomètre à 450 nm à l'aide du lecteur de microplaque Stat Fax. L'intensité colorimétrique est inversement proportionnelle à la concentration de la mycotoxine dans l'échantillon (Verdon-Delor et Raimbault, 2006).

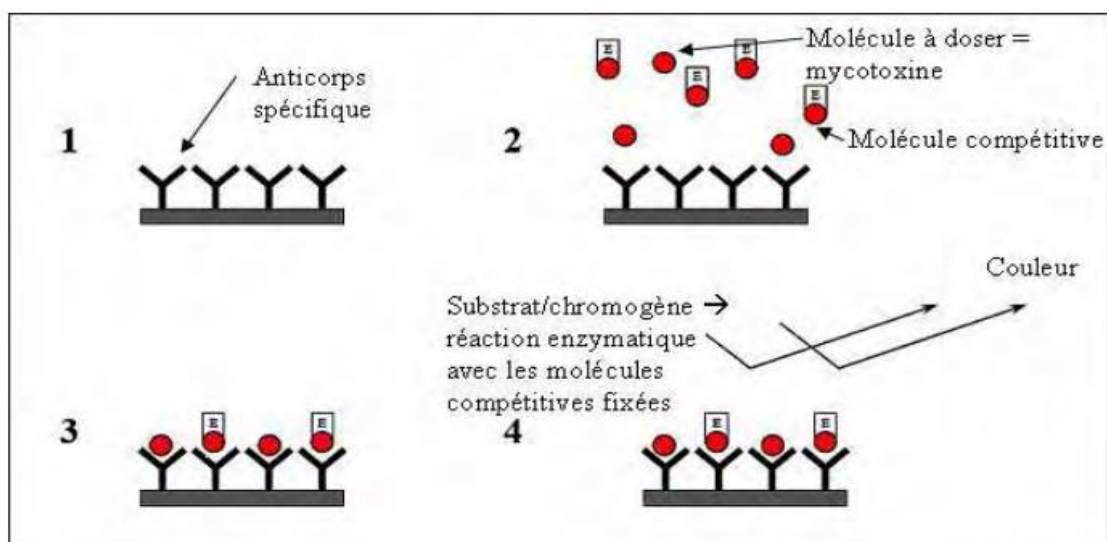


Figure 11 : Schéma de la méthode de dosage par ELISA type compétition.

4.3 Kits utilisés

Les kits utilisés dans ce travail sont : le kit AgraQuant® Aflatoxines totales et le kit AgraQuant® ochratoxines (Romer labs, Autriche).

4.4 Dosage des mycotoxines

L'évaluation quantitative des mycotoxines : Aflatoxines totales et ochratoxins a été effectuée par la technique d'ELISA par compétition, en utilisant les kits selon la procédure recommandée par le fabricant (Verdon-Delor et Raimbault, 2006).

Des quantités de 200 µl de mycotoxines conjuguées liées à la peroxydase (fournis avec le kit) sont distribuées dans les puits de plaques de microtitration, puis 100 µl de standard et d'échantillons à doser sont rajoutés à chaque puits colorés de dilution. Ensuite 100 µl de ce mélange sont transférés dans les puits recouverts d'anticorps. La plaque est incubée pendant 5 à 20 minutes selon les kits, (tableau 8) à la température ambiante. Après incubation, chaque puits de la plaque est alors lavé 5 fois à l'eau désionisée ou une solution tampon. La révélation de l'anticorps lié à l'antigène fixé sur la plaque est réalisée par l'addition de 100 µl de substrat chromogénique à chaque puits. L'ensemble est mélangé doucement et incubé pendant cinq minutes à la température ambiante dans l'obscurité. 100 µl du réactif stop est ajouté par la suite dans chacun des puits. Les micro-puits sont ensuite analysés au spectrophotomètre à l'aide du lecteur de microplaque Stat Fax, ayant un filtre d'absorbance de 450 nm et un filtre différentiel de 630 nm, dont l'absorbance est inversement proportionnelle à la concentration de la

mycotoxine dans l'échantillon. Les absorbances des échantillons sont comparées à celles des standards et un résultat permettant l'interprétation ainsi fourni avec le kit.

Tableau 8 : *Conditions d'utilisation des kits pour le dosage ELISA des mycotoxines*

Kits	Aflatoxines	Ochratoxine	DON	Toxine T-2	Fumonisines
Solution d'extraction	Méthanol/eau (70/30 (v/v))	Méthanol/eau (70/30 (v/v))	Eau distillée	Méthanol /eau (70/30 (v/v))	Méthanol/eau (70/30 (v/v))
Dilution	Sans	Sans	1/4 ^e avec de l'eau distillée	1/10 ^e avec de l'eau distillée	1/20 ^e avec de l'eau distillée
Temps de la 1^{ère} incubation	15 min	10 min	15 min	10 min	10 min
Solution de Lavage	Eau distillée	Eau distillée	La solution de lavage	Eau distillée	Eau distillée
Temps de la 2^{ème} incubation	5 min	5 min	5 min	5 min	5 min

4.5 Interprétation des résultats

En utilisant les valeurs non modifiées de DO ou les valeurs exprimées en pourcentage de la DO du standard zéro (0), une courbe gamme étalon est tracée en utilisant les cinq standards. Comme la quantité de mycotoxines est connue pour chaque standard, les quantités inconnues peuvent être mesurées par extrapolation de cette courbe. Les résultats peuvent aussi être calculés en utilisant la feuille de calcul Log/Logit de Romer Labs fournie avec le kit.

Si un échantillon contient des niveaux de mycotoxines supérieurs au standard le plus élevé, l'extrait filtré doit être de nouveau dilué dans le méthanol à 70% de telle manière à ce que le résultat de l'échantillon dilué soit situé dans une gamme adéquate pour chaque type de mycotoxines et réanalysé pour obtenir des résultats exacts. Le facteur de dilution doit être absolument inclus dans le calcul du résultat final (Verdon-Delor et Raimbault, 2006).

5. Pourcentage d'adsorption

La quantité de toxines adsorbée ou dégradée est calculée par la différence de concentration entre le témoin (tampon seul) et dans le surnageant de chaque test, puis exprimée en pourcentage de toxine adsorbée (Kong et *al.*, 2014) selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'adsorption} = \frac{[C_0 - C]}{C_0} * 100$$

C₀ : Concentration initiale de mycotoxine (AFLAS ou ochratoxines)

C : Concentration des mycotoxines non adsorbées

6. Etude statistique

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne et l'écart type. La significativité des résultats est vérifiée par le test de l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph Pad Prism, version 5.03). Le seuil de significativité choisi est de 5 %.

III. Résultats

1. Pourcentage d'adsorption des aflatoxines *in vitro* par les sept produits testés

D'après la figure 12 et le tableau 9, et d'une manière générale, tous les produits testés (le NP1600®, le Mycofix®, Le Calibrin A, la bentonite B, la bentonite A, Le Calibrin et la stévensite) dans cette expérience ont fait baisser la concentration des aflatoxines totales par rapport au témoin. Le meilleur pourcentage de réduction des aflatoxines totales a été constaté avec le produit NP1600® avec 98,7%.

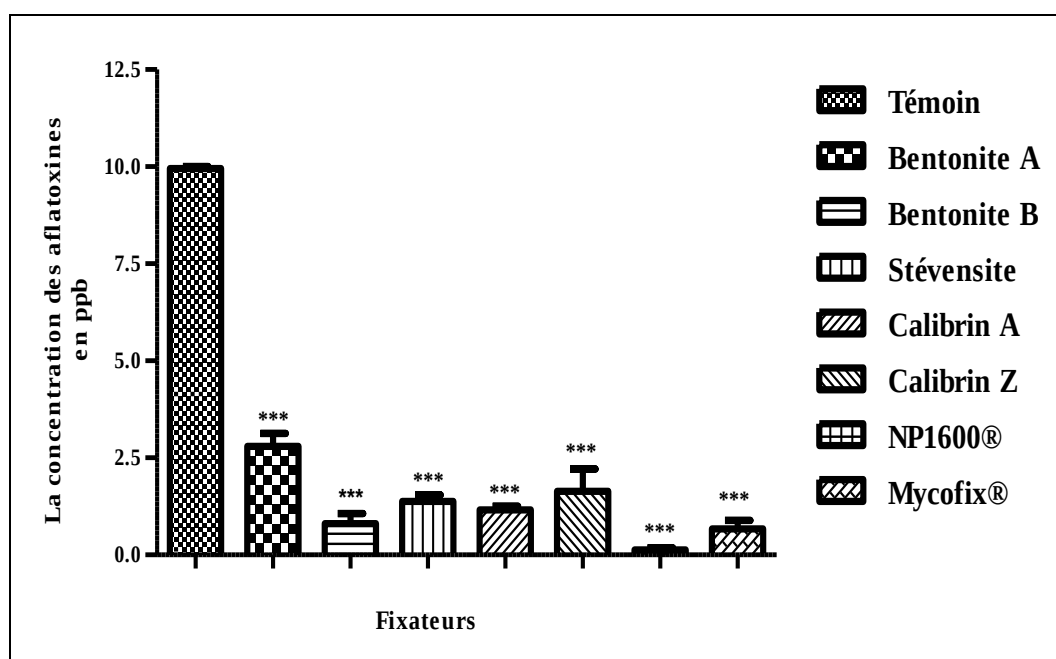


Figure 12 : Effet des agents fixateurs sur la concentration **des aflatoxines totales** dans le tampon phosphate en ng.g^{-1}

*** : $p <$ différence très hautement significative par rapport au témoin

Tableau 9 : Pourcentages d'adsorption des aflatoxines totales (par rapport au témoin) par les différents adsorbants testés dans le tampon phosphate.

Agents adsorbants	Concentration des aflatoxines en ng.ml ⁻¹		Pourcentage d'adsorption des aflatoxines
	Initiale	Finale	
Témoin	10	9,95 ± 0,05	
Bentonite A		2,80 ± 0,33 ***	71,85%
Bentonite B		0,81 ± 0,26 ***	91,85%
Stevensite		1,38 ± 0,17 ***	86,13%
Calibrin A		1,16 ± 0,09 ***	88,34%
Calibrin Z		1,64 ± 0,57 ***	83,52%
NP1600®		0,13 ± 0,049 ***	98,7%
Mycofix®		0.67 ± 0,22***	93.26%

2. Pourcentage d'adsorption des ochratoxines *in vitro* par les sept produits testés

Les résultats représentés sur la figure 13 montrent que la concentration des ochratoxines dans le lot traité au NP1600® est significativement inférieure ($p < 0,01$) à celle de l'échantillon témoin non traité. Le Mycofix® diminue également la concentration des ochratoxines d'une manière significative ($p < 0,05$). L'effet du NP1600® est plus prononcé que celui des autres produits testés. Ces derniers provoquent une très faible diminution de la concentration des ochratoxines à la dose utilisée par rapport au témoin, la différence étant non significative ($p > 0,05$).

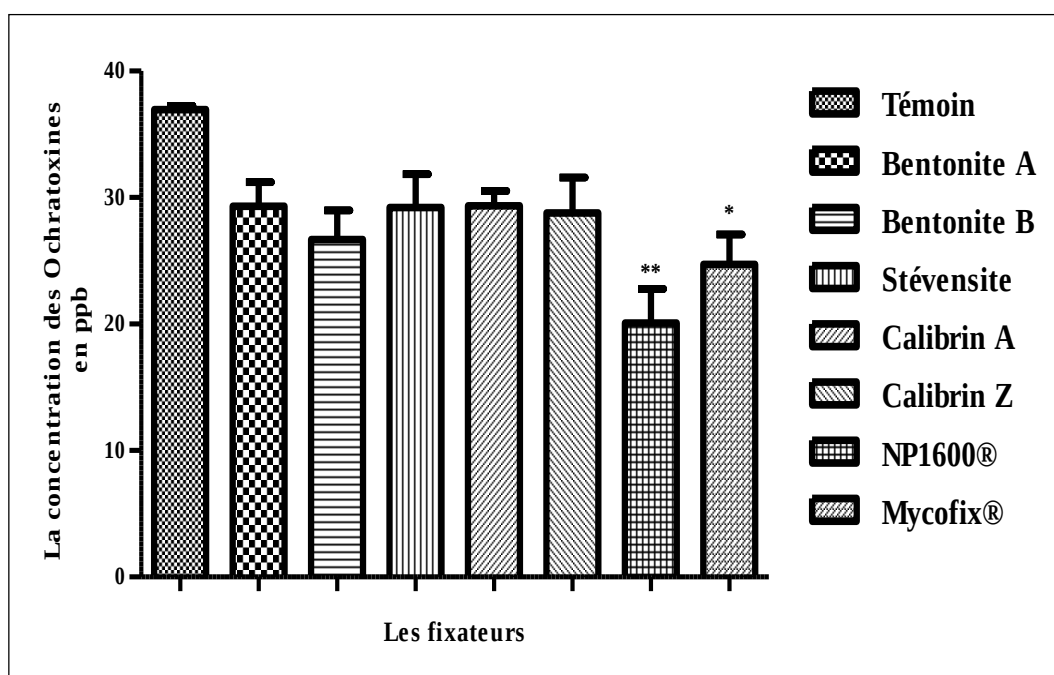


Figure 13 : Effet des agents fixateurs sur la concentration des ochratoxines dans le tampon phosphate en ng.g⁻¹

* : $p < 0,05$ différence significative par rapport au témoin

** : $p < 0,01$

Si nous traduisons les résultats en termes de pourcentage de réduction, nous remarquons que le NP1600® donne la meilleure réduction du taux des ochratoxines, il permet d'absorber 45,69% des ochratoxines (tableau 10). Les autres adsorbants testés ont montré une capacité d'adsorption variable en ochratoxines mais inférieure à celle du NP1600®.

Tableau 10 : Pourcentages d'adsorption des **ochratoxines** (par rapport au témoin) par les différents adsorbants testés dans le tampon phosphate

Agents adsorbants	Concentration des Ochratoxines en ng.ml^{-1}		Pourcentage d'adsorption des ochratoxines
	Initiale	Finale	
Témoin	37	$36.96 \pm 0,3$	0%
Bentonite A		$29.32 \pm 1,8$	20.67%
Bentonite B		$26.67 \pm 2,3$	27.84%
Stevensite		$29.21 \pm 2,6$	20.96%
Calibrin A		$29.35 \pm 1,18$	20.58%
Calibrin Z		$28.78 \pm 2,8$	22.13%
NP1600®		$20.07 \pm 2,7$ **	45.69%
Mycofix®		$24.73 \pm 2,3$ *	33.08%

IV. Discussion

La contamination fongique étant difficile à maîtriser, la décontamination des produits alimentaires se révèle donc être un enjeu important en santé humaine et animale mais également un enjeu économique. Plusieurs techniques de réduction en mycotoxines de la matrice alimentaire ont été élaborées avec plus ou moins de succès comme l'ionisation et l'inactivation des mycotoxines par la température. Les inconvénients majeurs de ces techniques sont la détérioration de l'aliment ainsi que le coût et la méconnaissance des effets que peuvent avoir les produits de dégradation (Schatzmayr et *al.*, 2006 ; Kolosova et Stroka, 2011).

D'autres méthodes plus récentes consistent à empêcher que les mycotoxines ne soient absorbées au niveau du tube digestif (Khatoon et *al.*, 2016). L'une des méthodes les plus efficaces semble être l'utilisation de composés adsorbants, c'est-à-dire des produits qui lient à leur surface, de manière plus ou moins spécifique, les mycotoxines, les rendant moins biodisponibles. Les adsorbants ajoutés à l'aliment, n'étant pas assimilés par l'organisme, sont évacués avec les déjections en emportant les mycotoxines qu'ils ont fixés.

Afin d'évaluer l'efficacité d'adsorption des mycotoxines par le produit développé dans le laboratoire industriel (LIAV) qui est le NP1600, d'autres adsorbants ont été testés : le Mycofix® (produit par la société Biomin, Autriche), le calibrin A et Z (produits par la société Amlan International, USA) et les argiles marocaines qui sont la bentonite A, la bentonite B et la stévensite (fournis par la société LIAV, Maroc).

Le NP1600 étant constitué d'huiles essentielles intercalées entre les feuillets d'argiles, ces HE sont stabilisées en étant fixées entre les feuillets d'argiles, ce qui les empêche de s'évaporer durant la fabrication de l'aliment et durant le stockage. Cette intercalation des molécules d'HE entre les feuillets d'argile représente aussi une forme d'activation de ces argiles, car elle augmente l'espace interfoliaire, ce qui améliore leur capacité d'adsorption des mycotoxines.

Dans ce contexte, nous avons décidé de mener une recherche expérimentale pour vérifier *in vitro*, si le NP1600® est capable de fixer les mycotoxines aussi bien que le Mycofix®, le calibrin A et Z et les argiles marocaines en utilisant un modèle *in vitro* qui mime le système digestif du porc (Kong et *al.*, 2014). Pour cela, nous avons testé l'adsorption de deux familles de mycotoxines : les ochratoxines (A et B) et les aflatoxines totales. Toutes ces mycotoxines sont connues pour leur impact négatif sur les élevages de volaille.

1. L'adsorption des aflatoxines

Tous les produits testés dans cette expérience ont montré une capacité d'adsorption des aflatoxines qui dépasse 70%. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Kong et *al.* (2014), qui ont montré que des fixateurs testés tels que les argiles de type bentonite (A, B, C, D et E), un produit à base des levures et le charbon activé fixent plus de 70% des aflatoxines dans un modèle qui mime le système digestif du porc. Nos résultats montrent que le produit le plus efficace est le NP1600® (98,7%) suivi par le Mycofix® (93,26%), la bentonite B (91,85%), le calibrin A (88,34%), la stévensite (86,13%), le calibrin Z (83,52%) et enfin la bentonite A (71,85%). Une autre étude menée par Diaz et *al.* (2002) a montré que la bentonite a absorbé 95% de l'aflatoxine B1. Cette supériorité du NP1600® pourrait être expliquée par le fait que le NP1600® contient un mélange d'argiles activées par l'intercalation des huiles. Cette forme d'activation favoriserait une meilleure fixation des aflatoxines. Le Mycofix® est constitué d'argiles et de parois de levures ce qui explique que le taux de fixation vient juste après celui du NP1600®. La différence de capacité d'adsorption des aflatoxines peut être liée au type, à la force et au nombre de liaisons formées entre les aflatoxines et les adsorbants (Saminathan et *al.*, 2018).

La bentonite, la Calibrin-A, la Calibrin-Z et la stévensite sont des argiles composées de montmorillonite. Qui est l'un des minéraux extensibles 2 : 1 phyllosilicate, les surfaces basales externes, les bords et l'espace interfoliaire sont des sites d'adsorption possibles pour l'aflatoxine B1 (Aisawa et *al.*, 2018). Les aflatoxines ont été caractérisées comme des molécules relativement hydrophiles avec une très forte capacité à s'adsorber sur les surfaces argilleuses (Boudergue et *al.*, 2009). Les cations métalliques (Al^{3+} ou autres) présents dans les argiles forment des liaisons de coordination avec le β -dicarbonyl de l'aflatoxine, expliquant la grande capacité d'absorption des argiles phyllosilicatées (Phillips et *al.*, 1995).

2. L'adsorption des ochratoxines

Les résultats obtenus montrent que le NP1600® donne la meilleure réduction du taux des ochratoxines car il permet d'absorber 45,69% de celles-ci. Le Mycofix® provoque une réduction de 33,08%. Les autres produits testés provoquent une réduction des ochratoxines comprise entre 20 et 27%. Cette supériorité du NP1600® pourrait être due à sa composition puisqu'il est constitué d'huiles essentielles intercalées entre les feuillets d'argiles marocaines. Cette intercalation a été confirmée par des analyses de diffraction aux rayons X (DRX). On remarque que la fixation des ochratoxines n'a pas dépassé 46% par le NP1600®. Ce

pourcentage moyen de fixation est dû au fait que les ochratoxines sont des molécules hydrophobes pour lesquelles les argiles ont une faible affinité.

La supériorité observée du NP1600[®] par rapport aux autres produits testés peut également s'expliquer par le fait que les argiles du NP1600[®] sont intercalées par des huiles qui sont aussi hydrophobes. La présence de ces huiles augmente forcément l'affinité pour les molécules hydrophobes comme les ochratoxines.

L'efficacité d'adsorption *in vitro* du Mycofix[®] était de 33%, ce qui est inférieur par rapport à l'efficacité du NP1600[®]. L'efficacité d'adsorption du Mycofix[®] est basée sur la création d'une liaison hydratée entre la mycotoxine et le composant inorganique de l'adsorbant (Trailović et *al.*, 2013). De plus, cet agent adsorbant de composition mixte, puisqu'il est constitué en plus des argiles, de parois de levures et d'enzymes, provoque une inactivation enzymatique des groupes fonctionnels de la mycotoxine et une désactivation de la mycotoxine par des enzymes spécifiques provenant de microorganismes. Garcia et *al.* (2003) et Trailović et *al.* (2013) ont étudié l'efficacité d'adsorption du Mycofix[®] par rapport à l'OTA *in vitro* et ont rapporté un pourcentage d'adsorption de l'ordre de 30%.

Les résultats de cette étude *in vitro* ont aussi montré que les adsorbants inorganiques qui sont la bentonite A, la bentonite B et la stévensite ont absorbé respectivement 20, 27 et 20% des ochratoxines, ce qui corrobore les résultats de Pappas et *al.* (2014) qui ont rapporté que la bentonite absorbe environ 17% d'ochratoxine A.

**Chapitre II : Evaluation *in situ* de l'action du Mycofix[®], du NP1600[®]
et des argiles marocaines sur la production des mycotoxines et le
développement des moisissures dans la farine de maïs**

I. Introduction

La contamination des aliments du bétail par les mycotoxines constitue un problème de plus en plus préoccupant en élevage, et particulièrement chez la volaille (Betina, 1994). L'aliment qui sert pour l'aviculture, peut être un substrat pour le développement de moisissures qui, sous certaines conditions d'humidité, peuvent produire des mycotoxines (Jard, 2009).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par une grande variété de moisissures principalement celles des genres *Fusarium*, *Aspergillus* ou *Penicillium* (Betina, 1994). Elles sont d'origines chimiques très diverses. Certaines dérivent d'acides aminés (alcaloïdes de l'ergot du seigle, acide cyclopiazonique...), d'autres des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine A, citrinine, patuline...) ; d'autres encore sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol (DON), toxine T2,...) (Betina, 1994) ou enfin des dérivés d'acides gras (Fumonisines). Ces mycotoxines se développent sur différents types de produits primaires (céréales, oléoprotéagineux, fruits, noix, amandes, fourrages) et dans des situations écologiques très diverses (AFSSA, 2009). Du fait de leur transfert dans la chaîne alimentaire végétale et animale, ces mycotoxines se retrouvent dans l'alimentation humaine.

Les mycotoxines restent très stables durant le stockage et ne sont pas détruites par les procédés technologiques de préparation de l'aliment comme la cuisson et la stérilisation. Les mycotoxines restent donc présentes dans l'aliment « fini », même après la disparition des moisissures (CAST, 2003).

L'exposition aux mycotoxines peut engendrer par conséquent une toxicité aiguë ou chronique allant des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, les appareils digestif et urinaire jusqu'à la mort (Bennet et Klich, 2003 ; AFSSA, 2006). Elles peuvent aussi avoir des effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (Denli et Okan, 2006). Le pouvoir que possèdent certaines mycotoxines d'altérer le système immunitaire et de réduire ainsi la résistance aux infections, est maintenant largement considéré comme l'effet le plus important (Peraica, 1999).

Le premier but du présent travail est de comparer *in situ* l'action de différents adsorbants tels que le NP1600[®], le Mycofix[®] ou les argiles sur la production des mycotoxines dans la farine de maïs. Les mycotoxines étudiées sont la toxine T2, les fumonisines totales (B1, B2 et B3), le Déoxynivalénol (DON) et les aflatoxines totales (B1, B2, G1 et G2). Parallèlement, le suivi du développement de la charge fongique du maïs a été effectué après 8 mois de stockage.

II. Matériel et méthodes

1. Les fixateurs

Les produits testés qui sont des agents fixateurs de mycotoxines sont :

- Le **Mycofix®** : c'est un produit utilisé dans le commerce comme étant un adsorbant des mycotoxines polaires et qui dégrade enzymatiquement les tricothécènes et la zéaralénone. Il est destiné à la volaille à la dose de 1,5 à 2,5 g par kg d'aliment. Le Mycofix® est fourni par la société Biomin, Autriche.
- Le **NP1600®** : c'est un produit alternatif à base des composés naturels, développé par notre laboratoire, breveté et homologué par l'ONSSA (Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires) : 2532/ONSSA/DSV/DPIV/13. Le NP 1600 est destiné à la volaille à la dose de 1 à 2 g par kg d'aliment. Il est fourni par la société LIAV (Laboratoire Industriel d'Alternatives Vétérinaires, Fès).
- Les **argiles non activées** : il s'agit de la combinaison de trois argiles marocaines (1/3 de bentonite A, 1/3 de bentonite B et 1/3 de stevensite).

2. Préparation des échantillons de maïs

A la quantité de 10 kg de farine de maïs contaminé naturellement, nous avons ajouté 5% d'eau afin d'augmenter l'humidité et favoriser la croissance des moisissures capables de sécréter les mycotoxines. La farine de maïs humidifiée a été ensuite répartie sur 10 boîtes comportant chacune 1 kg (10 lots).

Sur chacune des boîtes, les produits (NP1600®, Mycofix® ou La combinaison de trois argiles) sont ajoutés et mélangés avec le maïs dans les proportions suivantes :

- ✓ Lot 1 : lot témoin 1 kg de farine de maïs
- ✓ Lot 2 : 1 kg de farine de maïs + 1 g de NP1600®
- ✓ Lot 3 : 1 kg de farine de maïs + 2 g de NP1600®
- ✓ Lot 4 : 1 kg de farine de maïs + 4 g de NP1600®
- ✓ Lot 5 : 1 kg de farine de maïs + 1 g de Mycofix®.
- ✓ Lot 6 : 1 kg de farine de maïs + 2 g de Mycofix®.
- ✓ Lot 7 : 1 kg de farine de maïs + 4 g de Mycofix®.
- ✓ Lot 8 : 1 kg de farine de maïs + 1 g du mélange des argiles.
- ✓ Lot 9 : 1 kg de farine de maïs + 2 g du mélange des argiles.
- ✓ Lot 10 : 1 kg de farine de maïs + 4 g du mélange des argiles.

Les différents lots ont été incubés à 25°C pendant 8 mois.

3. Dosage des mycotoxines par la technique d'ELISA par compétition directe

3.1 Kits utilisés

Les kits utilisés dans ce travail sont : le kit AgraQuant® Aflatoxines totales (COKAQ1100), le kit AgraQuant® Deoxynivalenol (DON) (COKAQ4000), le kit AgraQuant® Fumonisines totales (COKAQ3048) et le kit AgraQuant® toxine T2 (COKAQ6000). Ils nous ont été fournis par Romer labs.

3.2 Extraction des mycotoxines

Après 8 mois d'incubation à 25°C, et à partir des boîtes de 100 g, des échantillons de 20 g de chaque lot ont été prélevés pour le dosage des mycotoxines. Chaque échantillon de 20 g de maïs prélevé a été placé dans un récipient en verre, hermétiquement fermé, puis 100 ml de la solution d'extraction méthanol/eau (70/30 (v/v)) est ajoutée et le flacon est fermé. Les échantillons sont mixés pendant 3 minutes puis sont laissés décanter, et la couche supérieure de cette solution est ensuite récupérée. 100 µl du filtrat est distribué dans les puits pour le test du dosage immunoenzymatique de mycotoxines.

3.3 Dosage des mycotoxines

L'évaluation quantitative des mycotoxines qui sont la Deoxynivalenol (DON), la Toxine T2, les Aflatoxines totales et les fumonisines totales, dans les échantillons de maïs, a été effectuée par la technique d'ELISA par compétition en utilisant les kits (Verdon-Delor et Raimbault, 2006).

4. Action du NP1600®, du Mycofix® ou du mélange d'argiles sur le développement de la charge fongique dans la farine de maïs

4.1 Evaluation de la charge fongique

À partir de 10 boîtes de maïs traités au mélange d'argiles, au NP1600® ou au Mycofix® (aux doses de 1 g ; 2 g ou 4 g) ou témoin, des échantillons de 10 g de la farine de maïs ont été prélevés pour l'évaluation de la charge fongique. 10 g de la farine de maïs est mis dans un tube stérile contenant 90 ml de NaCl 9 ‰. A partir de ces solutions mères, des dilutions de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} sont effectuées. 100 µl de solutions diluées sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant 20 ml du milieu Sabouraud, en triplicate.

Le dénombrement de moisissures est effectué après l'incubation de celles-ci à 25 °C pendant 5 jours. Le comptage des Unités Formant Colonies (UFC) est fait pour les boîtes contenant entre 10 et 100 UFC, et les résultats sont exprimés en UFC.g⁻¹ de maïs.

5. Etude statistique

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne et l'écart type. La significativité des résultats a été vérifiée par le test de l'ANOVA (analyse de variance) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph Pad Prism, version 5.03). Le degré de significativité choisi est de 5% à $P < 0.05$.

* : $p < 0,05$ différence significative

** : $p < 0,01$ différence hautement significative

*** : $p < 0,001$ différence très hautement significative

III. Résultats

1. Dosage de la toxine T2

Le tableau 11 montre que pour tous les fixateurs testés, plus la dose du produit augmente, plus le taux de mycotoxines diminue.

Pour les agents fixateurs utilisés à la dose de 1 g.kg⁻¹, les résultats montrent que la concentration de la toxine T2 dans le lot traité au NP1600[®] est significativement inférieure ($p < 0,01$) à celle du témoin. L'effet du NP1600[®] est plus prononcé que celui du Mycofix[®] et des argiles. Le Mycofix[®] montre un effet modéré par rapport au témoin ($p < 0,05$). Les argiles testées dans ce travail, provoquent une très faible diminution de la toxine T2 à la dose de 1 g.kg⁻¹ par rapport au témoin, la différence est non significative ($p > 0,05$).

Une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration de la toxine T2 après l'addition de 2 g de NP1600[®], a été constatée par rapport au lot témoin. Pour les échantillons traités aux argiles et au Mycofix[®], cette diminution est hautement significative à $p < 0,01$.

La figure 14 montre qu'après l'addition des fixateurs à la dose 4 g.kg⁻¹, le NP1600[®] et les argiles sont les plus performants pour faire baisser la concentration de Toxine T2,

Si nous traduisons les résultats en termes de pourcentage de réduction, nous remarquons que le NP1600[®] donne la meilleure réduction du taux de la toxine T2, suivi par celle des argiles puis par le Mycofix[®].

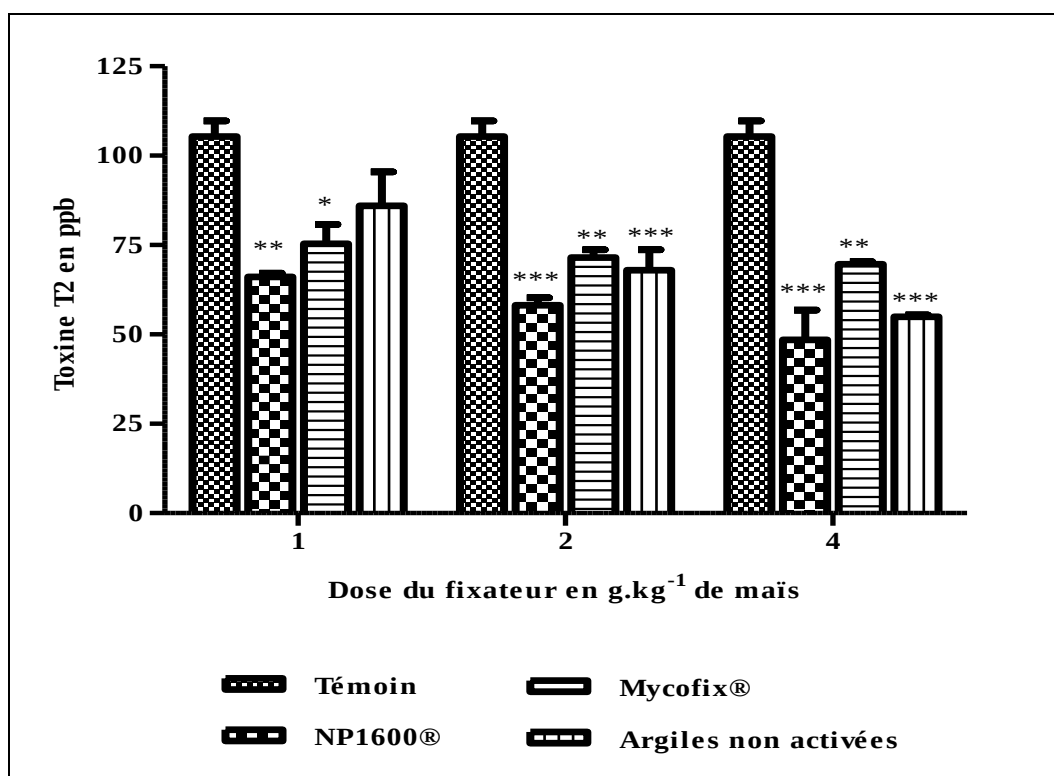


Figure 14: Effet du NP1600, Mycofix et des argiles non activées sur la production de la toxine T2 dans les échantillons de maïs en ng.g⁻¹ après 8 mois de stockage

* : p<0,05 différence significative entre le lot témoin et les autres lots.

** : p<0,01

*** : p<0,001

Tableau 11 : Pourcentages de réduction de la **toxine T2** par les différents produits

Doses en g.kg ⁻¹ Agent fixateur	% de réduction de la Toxine T2		
	1	2	4
NP1600®	37,23%	44,77%	53,92%
Mycofix®	28,44%	32,14%	33,86%
Argiles non activées	18,33%	35,48%	47,86%

2. Dosage des Fumonisines totaux

Les résultats de dosage des Fumonisines totaux sont rapportés sur la figure 15. Pour les trois produits testés, plus la dose des fixateurs augmente plus la concentration des fumonisines totaux diminue.

Pour la dose de 1 g.kg⁻¹, les résultats de la figure 15 montre que le NP1600[®] fait baisser le taux des fumonisines totaux avec une différence hautement significative (p<0,01) par rapport au témoin, suivi par le Mycofix[®] (p<0,05), alors que les argiles provoquent à la dose 1 g.kg⁻¹ une diminution non significative (p>0,05) de la concentration des fumonisines totales.

Les lots traités aux fixateurs à la dose de 2 ou 4 g.kg⁻¹, ont montré une diminution très hautement significative (p<0,001) de la concentration des fumonisines totaux par rapport au lot témoin, le NP1600[®] étant le plus efficace, suivi par les argiles et par le Mycofix[®]. La dose de 4 g.kg⁻¹ donne des résultats meilleurs que ceux de la dose 2 g.kg⁻¹.

L'expression de ces résultats en pourcentage de réduction montre que le Mycofix[®] et les argiles ne présentent pas un pourcentage de réduction puissant par rapport au NP1600[®] qui fait baisser le taux des fumonisines dosées dans les échantillons de maïs même à la dose de 1 g.kg⁻¹.

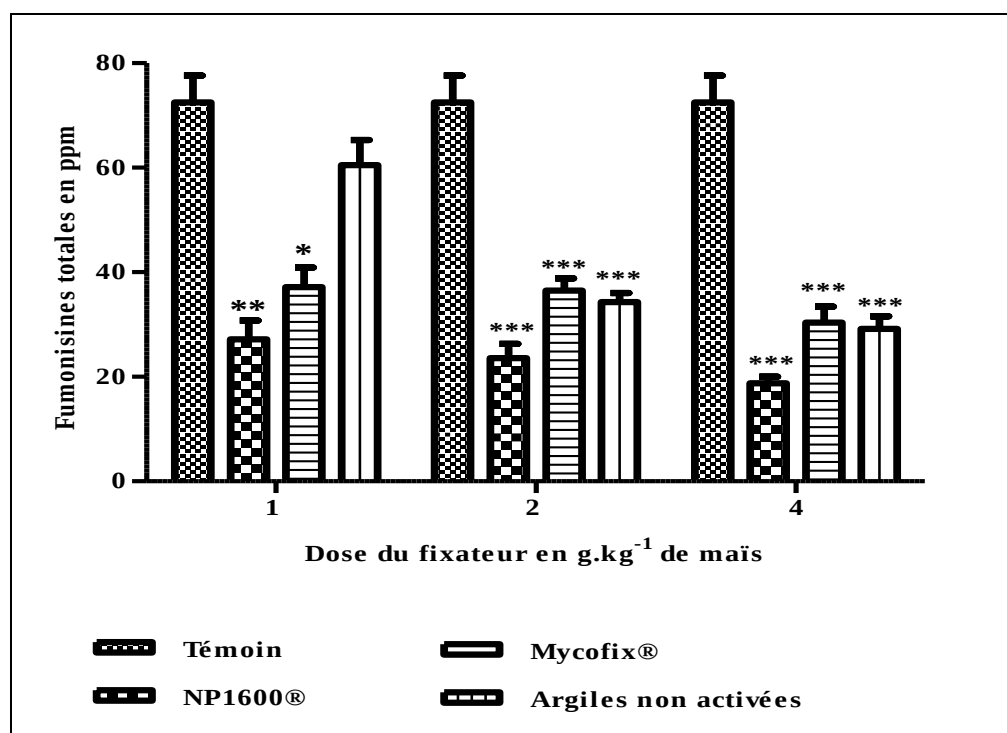


Figure 15 : Effet du NP1600, Mycofix et des argiles non activées sur la production des *Fumonisines totaux* dans les échantillons de maïs en µg.g⁻¹ après 8 mois de stockage

* : p<0,05 différence significative entre le lot témoin et les autres lots.

** : p<0,01

*** : p<0,001

Tableau 12 : Pourcentages de réduction des *Fumonisines totaux* par les différents produits

Doses en g.kg ⁻¹ Agent fixateur	% de réduction des Fumonisines totaux		
	1	2	4
NP1600®	62,56%	67,48%	74,09%
Mycofix®	48,72%	49,73%	58,12%
Argiles non activées	16,5%	52,72%	59,72%

3. Dosage du Déoxynivalénol (DON)

Le dosage du DON dans les différents échantillons, montre un effet dose réponse.

Les résultats de figure 16 montrent que pour la dose de 1 g.kg⁻¹ des fixateurs, le NP1600® est le plus efficace pour faire baisser la concentration du DON, avec une différence très hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au témoin, suivi par celui des argiles avec un seuil de significativité ($p < 0,01$). Aucune différence significative ($p > 0,05$) de la concentration du DON n'a été remarquée après l'addition de 1 g.kg⁻¹ du Mycofix®.

Avec les doses de 2 et 4 g.kg⁻¹ des différents produits testés, la concentration du DON chute d'une manière très brutale ($p < 0,001$). Les résultats obtenus avec les doses de 2 ou 4 g.kg⁻¹ sont similaires.

Ces résultats exprimés en termes de pourcentage de réduction montrent que le taux de réduction du DON à la dose de 1 g.kg⁻¹ par le NP1600® est plus important que celui des autres produits testés. En revanche, l'addition de 2 ou de 4 g.kg⁻¹ des différents produits testés, provoquent une diminution très importante de la concentration du DON avec tous les produits testés.

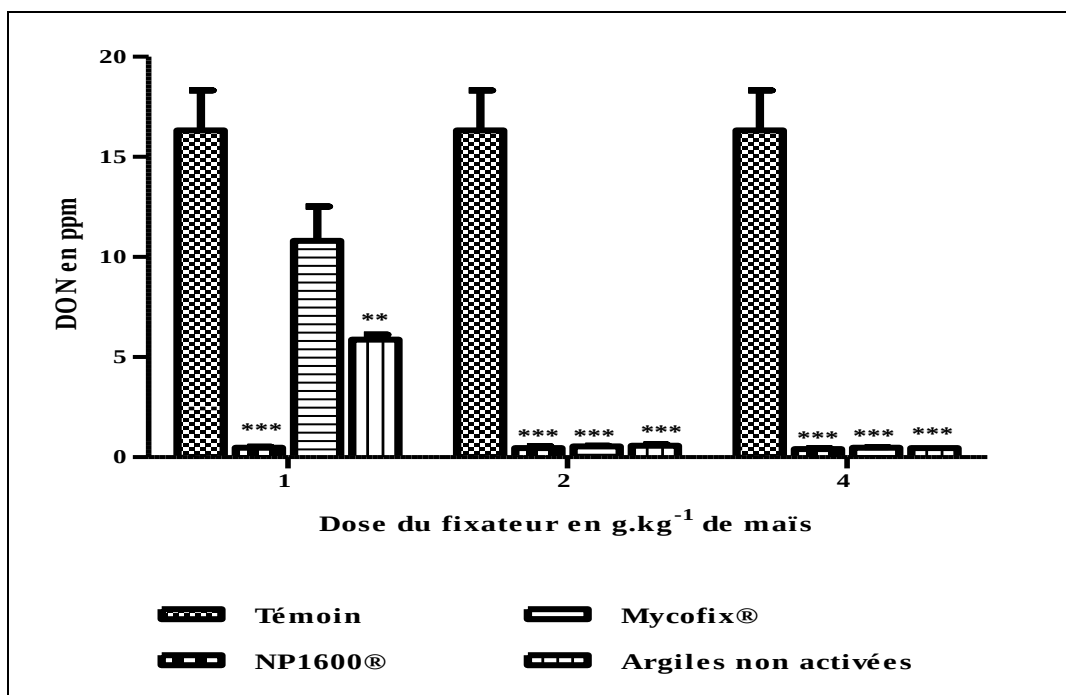


Figure 16 : Effet du NP1600®, Mycofix® et des argiles non activées sur la production du DON dans les échantillons de maïs en $\mu\text{g.g}^{-1}$ après 8 mois de stockage

** : $p < 0,01$ différence hautement significative entre le lot témoin et les autres lots

*** : $p < 0,001$

Tableau 13 : Pourcentages de réduction du DON par les différents produits

Doses en g.kg^{-1} Agent fixateur	% de réduction du DON		
	1	2	4
NP1600®	96,99%	97,18%	97,55%
Mycofix®	33,77%	96,69%	97,06%
Argiles non activées	63,93%	96,38%	97,18%

4. Dosage des aflatoxines totales

D'une manière générale, les trois produits (NP1600®, le Mycofix® et les argiles) testés dans cette expérience ont fait baisser la concentration des aflatoxines totales par rapport au témoin (figure 17). Cet effet est d'autant plus prononcé que la dose du produit est élevée. Le meilleur pourcentage de réduction des aflatoxines totales a été constaté avec le produit NP1600® d'une manière très hautement significative ($p < 0,001$).

Une diminution très très hautement significative ($P < 0,001$) de la concentration des aflatoxines dans les échantillons de maïs a été révélée après l'addition de 2 ou de 4 g.kg⁻¹ de différents fixateurs testés par rapport au témoin.

Nos résultats sont exprimés en pourcentage de réduction des aflatoxines totales par rapport au lot témoin (tableau 14), ils montrent que le produit le plus efficace est le NP1600® (87,96%) suivi par le Mycofix® (84,21%) puis par les argiles (83,07%).

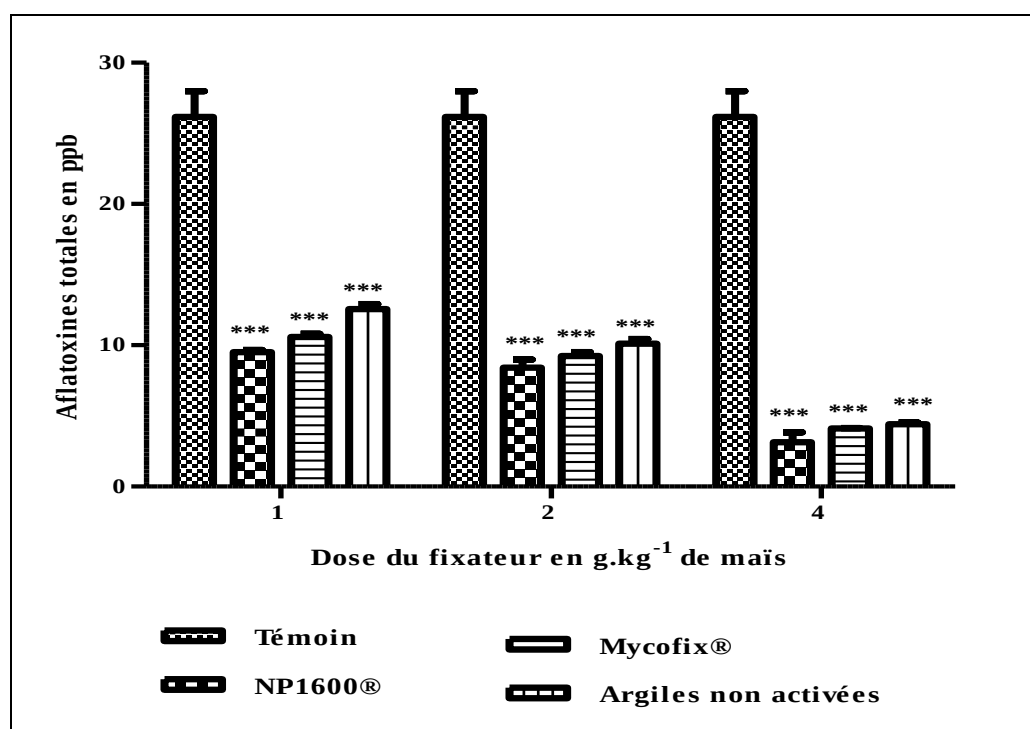


Figure 17 : Effet du NP1600, Mycofix et des argiles non activées sur la production des *Aflatoxines totales* dans les échantillons de maïs en ng.g⁻¹ après 8 mois de stockage

* ** : $p < 0,001$ différence très hautement significative entre le lot témoin et les autres lots.

Tableau 14 : Pourcentages de réduction des *Aflatoxines totales* par les différents produits

Doses en g.kg ⁻¹ Agent fixateur	% de réduction des aflatoxines totales		
	1	2	4
NP1600®	67,78%	63,62%	87,96%
Mycofix®	59,57%	64,65%	84,21%
Argiles non activées	52,00%	61,29%	83,07%

5. Action des produits sur le développement de la charge fongique dans les échantillons de maïs

Les résultats du dénombrement de la charge fongique dans la farine de maïs sont rapportés sur la figure 18. Les résultats du dénombrement de la charge fongique dans la farine de maïs ont décelé la présence d'un nombre moyen de germes par gramme de maïs de l'ordre de 10^4 UFC.g⁻¹ avant l'essai.

Après 8 mois d'incubation à 25°C, nous avons remarqué que le nombre de germes augmente jusqu'à 10^8 UFC.g⁻¹ pour le témoin non traité. Le comptage de la charge fongique après le traitement du maïs au NP1600® montre que ce dernier réduit la charge fongique d'une manière très significative par rapport au témoin (réduction de 4 facteurs log). Alors que le nombre de germes reste autour de 10^7 UFC.g⁻¹ pour les échantillons traités au Mycofix® ou aux argiles.

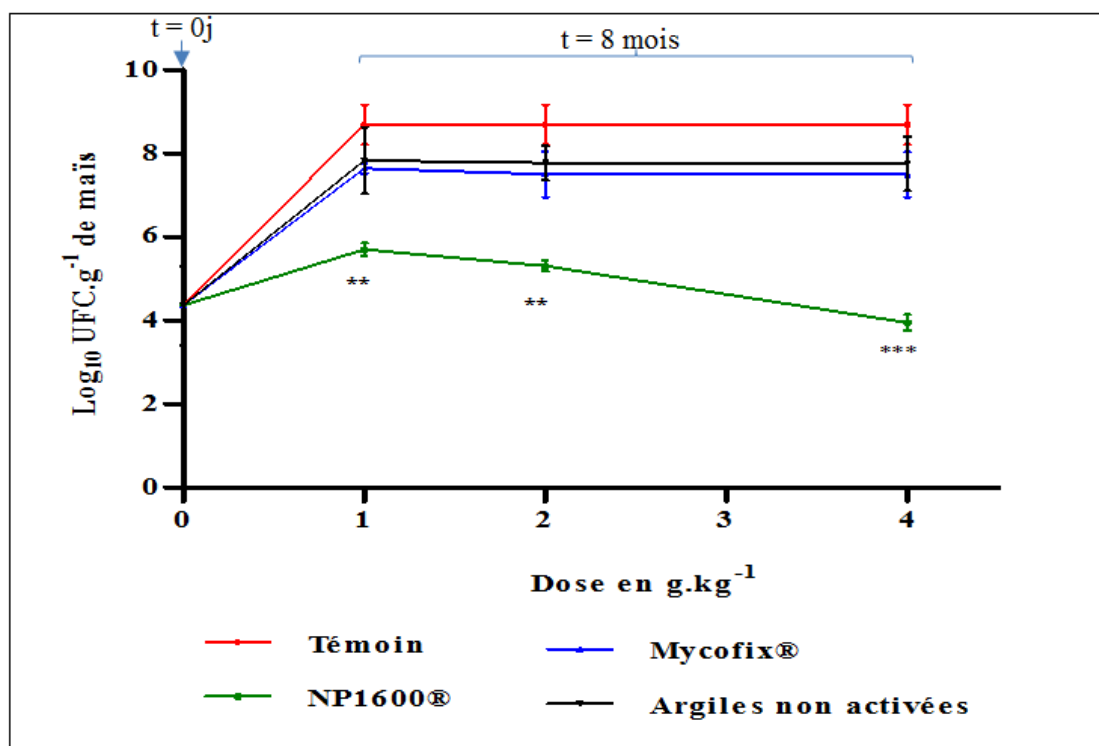


Figure 18 : Effet des agents fixateurs sur le développement de la charge fongique exprimée en log UFC, après 8 mois de stockage de la farine de maïs

** p < 0,01 différence hautement significative par rapport au témoin

*** p < 0,001 différence très hautement significative

IV. Discussion

Prévenir les risques de contamination des produits alimentaires par les moisissures et les mycotoxines constitue un défi majeur pour les intervenants dans les chaînes agroalimentaires. Diverses stratégies tentent de limiter le développement fongique et par conséquent la production des mycotoxines au champ, au moment de la récolte et lors du stockage. Mais, malgré toutes les précautions prises, certains contaminants peuvent survenir.

Devant la problématique grandissante de la contamination fongique, la production des mycotoxines qui s'en suit et l'émergence du problème d'insécurité, on assiste à l'installation de nouvelles stratégies préventives visant à limiter la contamination fongique et réduire ou même empêcher la production des mycotoxines. Dans ce but, de nombreux chercheurs se sont orientés vers des alternatives de réduction ou de lutte contre cette contamination, telles que la lutte naturelle fondée sur l'utilisation des différents métabolites des plantes médicinales notamment les huiles essentielles, car elles peuvent représenter un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont considérées comme une alternative importante pour résoudre le problème d'altération post-récolte liée aux moisissures et pour éviter la perte en qualité et en quantité des grains pendant le stockage (Serrano et *al.*, 2008 ; Naidoo et *al.*, 2008). Des études réalisées par Kedia et *al.* (2014) rapportent que l'huile essentielle de *Mentha spicata* est dotée d'une forte activité antifongique causant l'inhibition totale de la croissance de 19 moisissures d'altération des aliments dont les espèces *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp et *Fusarium* sp isolées à partir du blé. En outre, Böhme et *al.* (2014) montrent que l'huile essentielle de *Trachyspermum ammi* inhibe complètement la croissance d'*Aspergillus parasiticus*. En raison de leur efficacité et de leur coût peu élevé, les HE peuvent remplacer les autres méthodes utilisant les substances chimiques telles que l'acide propionique qui inhibe le développement des moisissures en abaissant le pH et en réduisant la formation d'ATP et l'ammoniac qui détruit la mycoflore globale, mais de façon temporaire (Yiannikouris et Jouany, 2002). Ces produits causent l'induction des phénomènes de résistance des genres mycotiques pathogènes et l'accumulation des résidus (Flamini et *al.*, 2003).

Les pertes importantes dans les élevages de volaille provoquées par les mycotoxines contenues dans l'aliment, se traduisent par un retard de croissance, d'une baisse de l'immunité favorisant les infections opportunistes et enfin par une morbidité et une mortalité importante (Stoev et *al.*, 2004 ; Patil, 2014 ; Fowler, 2015). Parmi les mycotoxines reconnues comme impliquées dans

ces pertes, on trouve les aflatoxines, la DON, les fumonisines, les ochratoxines et la toxine T2 (Betina, 2004), que l'on peut retrouver dans l'aliment composé pour volailles (soja, maïs).

Puisque la plupart des matières premières de l'aliment composé de volaille ne sont pas produites au Maroc, elles sont importées par voie maritime pendant plusieurs semaines, puis stockées au niveau du port dans des silos métalliques pouvant contenir plusieurs milliers de tonnes. Le stockage dans les pays d'origine, ainsi que le transport et le stockage dans des silos métalliques dans des conditions d'humidité et de température favorables au développement des moisissures font que le problème des mycotoxines est pratiquement inévitable pour les pays importateurs. Ces denrées sont alors porteuses d'une charge fongique importante dès leur arrivée aux ports Marocains. C'est la raison pour laquelle les usines de fabrication d'aliments composés de volailles se trouvent constamment confrontées au problème de la charge en mycotoxines au moment de la réception du maïs et des matières premières et aux réclamations des éleveurs qui leur retournent l'aliment composé et leur demandent des indemnisations pour les pertes subies.

Mises à part les pertes provoquées par les mycotoxines chez les éleveurs et chez les fabricants d'aliments composés, il y a le risque pour la santé du consommateur (JEFCA, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999). Les mycotoxines constituent un danger imminent lié à leurs effets sur la santé de l'Homme, sur la productivité animale et sur le commerce national et international. La FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines (Krska, 2009).

A notre connaissance, tous les produits existants sur le marché marocain sont importés. Ce sont soit des acides organiques tels que l'acide propionique, l'acide acétique et l'acide lactique (Noranda, 2005) qui se mélangent avec le maïs au moment du stockage et qui inhibent la croissance des moisissures, soit des fixateurs de mycotoxines utilisés comme additifs au moment de la fabrication de l'aliment composé, tels que les argiles activées (Bullerman et Bianchini, 2007) ou le charbon actif (Guerre, 2000), mais ne sont en général pas efficaces pour lutter contre toutes les mycotoxines. Ces agents inorganiques ont la capacité de fixer ou d'immobiliser certaines mycotoxines dans l'intestin pour réduire leur biodisponibilité (Soriano et Dragacci, 2004). C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'exploiter l'expérience de notre laboratoire dans le domaine de l'activité antifongique de substances naturelles (Chami et *al.*, 2004a ; Chami et *al.*, 2005 et Boudine et *al.*, 2016). Afin de contribuer à trouver une solution qui soit efficace et qui ne comporte pas un surcoût pour les professionnels.

Afin d'évaluer l'efficacité du produit développé dans notre laboratoire, nous nous sommes intéressées aux différents produits disponibles sur le marché, le Mycofix[®] (produit par la société Biomin et importé au Maroc par la société Fedravet). Ce choix nous a été confirmé par les fabricants d'aliment au Maroc. Ce produit est constitué d'argiles, de paroi de levure et d'enzymes capables de dégrader certaines mycotoxines.

Le laboratoire LIAV avait déjà mis au point un additif alimentaire pour l'aliment composé de volaille appelé NP1600[®] breveté et homologué par l'ONSSA (Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires): 2532/ONSSA/DSV/DPIV/13. Cet additif est fabriqué et distribué au Maroc par la société LIAV. Cet additif, conçu initialement pour remplacer les antibiotiques promoteurs de croissance, est constitué d'huiles essentielles intercalées entre les feuillets d'argiles marocaines. Cette intercalation a été confirmée par des analyses de diffraction aux rayons X (DRX) (résultats non publiés).

D'une part, les huiles essentielles qui rentrent dans sa composition, possèdent une activité antibactérienne, antifongique et antiparasitaire (Chami *et al.*, 2005 ; Remmal *et al.*, 2013 ; Boudine *et al.*, 2016). D'autre part, ces HE sont stabilisées en étant fixées entre les feuillets d'argiles, ce qui les empêche de s'évaporer durant la fabrication de l'aliment et durant le stockage. Cette intercalation des molécules d'HE entre les feuillets d'argile représente aussi une forme d'activation de ces argiles, ce qui leur permet de fixer les mycotoxines. Si cette hypothèse s'avère juste, cela fera du NP1600[®] un produit à quadruple action : fixation de mycotoxines, action antifongique, antiparasitaire et antibactérienne.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons essayé de vérifier *in vitro* si le NP1600[®] est capable de fixer les mycotoxines tout en comparant son action avec celle du Mycofix[®] et avec un mélange d'argiles marocaines non intercalées par les HE.

1. L'activité du Mycofix[®], du NP1600[®] et des argiles marocaines sur la production des mycotoxines dans la farine de maïs

Dans ce test, nous avons préféré utiliser une farine de maïs plutôt que des graines entières, et ce pour favoriser au maximum le contact entre les moisissures et les matières nutritives contenues dans les graines. Cette farine a en plus été incubée à 25°C dans des boîtes en plastique hermétiquement fermées de telle sorte que l'atmosphère à l'intérieur de la boîte soit saturée en humidité. Cette incubation a duré 8 mois.

Afin d'évaluer la teneur en mycotoxines dans ce test nous avons utilisé une méthode immunoenzymatique (ELISA) par compétition directe. Cette méthode permet de quantifier

chaque mycotoxine grâce à des anticorps spécifiques. C'est une méthode fiable qui est facile, rapide et moins coûteuse que la méthode HPLC.

Les résultats obtenus montrent que nos conditions expérimentales permettent d'avoir des taux de mycotoxines au moins deux fois supérieures à la valeur tolérée par les normes internationales (UE, 2016), ce qui signifie que ces conditions expérimentales sont valables pour évaluer l'efficacité des produits testés. Ces résultats montrent que le Mycofix[®] est capable de réduire le taux de toutes les mycotoxines dosées en fonction de la dose, les résultats de différents dosages de mycotoxines montrent que les argiles sont au moins aussi efficaces que le Mycofix[®] *in vitro* en terme de réduction du taux de mycotoxines.

Nos résultats montrent aussi que le NP1600[®] à la dose de 1 g.kg⁻¹ montre une efficacité meilleure que celle du Mycofix[®]. A la dose de 2 g.kg⁻¹, l'action du NP1600[®] est nettement supérieure à celle du Mycofix[®] et des argiles quelle que soit la mycotoxine dosée. A la dose de 4 g.kg⁻¹, le NP1600[®], le Mycofix[®] et les argiles montrent des résultats semblables. L'avantage du NP1600[®] est qu'il exerce son action inhibitrice sur les mycotoxines à la plus faible concentration testée qui est de 1 g.kg⁻¹, alors que les autres n'exercent une activité semblable que si la dose devient très importante (4 g.kg⁻¹). Ceci peut s'expliquer soit par son action antifongique qui réduit le nombre de moisissures sécrétrices de mycotoxines, soit par l'effet fixateur des argiles qu'il contient soit par l'action des deux à la fois.

2. Effet du NP1600[®], du Mycofix[®] et des argiles non activées sur le développement de la charge fongique dans les échantillons de maïs

De nombreux travaux ont montré l'effet antifongique des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires sur les moisissures contenues dans les grains de maïs (Mylona, 2012 ; Bluma et *al.*, 2008 ; Bouddine et *al.*, 2012).

Dans le présent travail, nous avons suivi la charge en moisissures dans la farine de maïs après 8 mois de stockage. Les résultats obtenus (figure 18) montrent que le nombre de moisissures en log UFC.g⁻¹ de la farine de maïs est passé de 4.3 log UFC.g⁻¹ à environ 8.7 chez le lot témoin non traité. Dans le cas du Mycofix[®] et du mélange d'argiles, la charge était de l'ordre de 7.5 log UFC.g⁻¹. Cette faible inhibition de la croissance est probablement due à l'absorption de l'eau par les argiles et le Mycofix[®] qui diminueraient ainsi l'activité de l'eau contenue dans la farine de maïs comparée à la farine témoin non traitée. Avec le NP1600[®], le nombre de moisissures est de l'ordre de 5.5 log UFC.g⁻¹ pour la dose de 1 et 2 g.kg⁻¹ et 3.9 log UFC pour la dose 4 g.kg⁻¹. Cette très forte réduction ne peut s'expliquer que par une action antifongique très prononcée du

NP1600[®], qui est probablement due aux CM des HE huiles contenues dans le NP1600[®]. Bluma et al., (2008) a montré que les huiles essentielles du clou de girofle et du thym inhibent la croissance d'*Aspergillus Flavi* et la production des aflatoxines dans les graines de maïs. Boukaew (2017) a montré que la fumigation des graines de maïs par les huiles essentielles du clou de girofle et de vatica inhibe complètement la croissance, la sporulation, la germination des conidies d'*Aspergillus*. Nos résultats sont en concordance avec les travaux d'Omidbeygi et al. (2007) qui ont montré que les HE de thym et de sarriette inhibent le développement d'*A. flavus*. Dans le même contexte, une étude menée par Amiri et al. (2008) a montré l'efficacité de l'eugénol, composé majoritaire de l'HE de girofle, *in vitro* sur quatre agents pathogènes post-récolte de la pomme qui sont *Phlyctema vagabunda*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* et *Monilinia fructigena*. Une étude menée par Jeff-Agboola et al. (2012) a montré également l'effet antifongique *in vitro* des HE de *Cymbopogon citratus*, d'*Allium sativum*, d'*Ocimum basilicum*, de *Zingiber officinalis*, de *Citrus limon* et de *Citrus aurantifolia* sur une espèce d'*A. flavus* toxigène isolée à partir de l'aliment de volaille contaminé. Enfin, une étude menée par Camele et al. (2010) a montré que les HE de verbena, de thym ou d'origan peuvent être utilisées comme fongicides pour contrôler la contamination par les champignons pathogènes post-récolte du maïs sans aucun risque de phytotoxicité.

Un autre mode d'action des huiles essentielles a été récemment mis en évidence pour les huiles n'ayant pas un effet sur la croissance du champignon producteur de mycotoxines mais plutôt sur la production des leurs toxines (Ferrara et al., 2015). Les huiles essentielles ou leurs composants actifs se sont révélés en effet capables d'inhiber la production de l'OTA et que cette réduction n'était pas en corrélation avec la réduction de la masse fongique (Murthy et al., 2009, Hua et al., 2014). Cette diminution de la production a été attribuée à la répression de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette toxine. Ainsi, ces résultats nous amènent à penser que le NP1600[®] exerce une réduction du taux de mycotoxines en utilisant les deux propriétés qui sont l'action antifongique des huiles essentielles et l'action de fixateur de mycotoxines des argiles, alors que les argiles seules et le Mycofix[®] provoquent une réduction des mycotoxines (juste en diminuant l'activité de l'eau de la farine) et en fixant les mycotoxines.

V. Conclusion

À la lumière de cette étude *in vitro*, on peut conclure que les trois fixateurs de mycotoxines ont la capacité de réduire la concentration de différentes mycotoxines. Le NP1600[®] a un intérêt particulier parce qu'il exerce son action inhibitrice sur les mycotoxines à la plus faible concentration testée qui est de 1 g.kg⁻¹.

Quant à la comparaison de l'efficacité du NP1600[®] à celle du Mycofix[®] et des argiles, les résultats obtenus indiquent que le NP1600[®] a une activité inhibitrice meilleure que celle des autres fixateurs, surtout à la faible concentration.

L'activité antifongique du NP1600[®] a été également démontrée, en comparaison avec celle des produits testés. Les résultats suggèrent que les HE contenues dans le NP1600[®] réduisent le degré de contamination par les moisissures, d'où l'intérêt de son application comme alternative aux produits chimiques utilisés dans les structures de stockage des céréales.

D'une manière générale le NP1600[®] a montré une grande efficacité dans la lutte à la fois contre les mycotoxines et contre la charge fongique dans la farine de maïs.

Afin de confirmer ces résultats et hypothèses, des essais *in vivo* ont été réalisés sur des poussins recevant un aliment contenant de NP1600[®] ou de Mycofix[®] pour les comparer.

**Partie II : Evaluation de l'action du NP1600[®] ou du Mycofix[®]
in vivo dans la lutte contre les mycotoxines chez le poulet de
chair**

Chapitre I : Evaluation de l'action du NP1600[®] et du Mycofix[®] *in vivo* dans la prophylaxie de l'ochratoxicose chez le poulet de chair

I. Introduction

Les céréales constituent des aliments de base dans l'alimentation humaine et animale. Elles ont un pouvoir nutritionnel important (Multon, 1982 ; Molinié et Pfohl-Leszkowicz, 2003). Les principales espèces de céréales cultivées appartiennent à la famille des graminées telles que le blé tendre, le blé dur, le maïs, le riz, l'avoine, le seigle, le millet et le sorgho. Elles peuvent être contaminées par les moisissures dans le champ ou lors du stockage. Les moisissures isolées les plus fréquemment des céréales appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*. La présence de ces moisissures constitue un risque sanitaire pour le consommateur en raison de leur capacité à produire et à accumuler les mycotoxines (Tantaoui-Elaraki et Beraoud, 1994 ; Meyer et *al.*, 2004). Parmi ces dernières, l'ochratoxine est considérée comme l'une des plus dangereuses. L'aviculture est particulièrement affectée par cette mycotoxine. Les poulets et les dindes y sont sensibles. Les signes pathologiques de l'ochratoxicose aviaire sont la réduction du gain de poids, l'augmentation de l'indice de consommation, la diminution de la production d'œufs, la mauvaise qualité de la coquille et la néphrotoxicité (Santin, 2003 ; Denli, 2008 ; Sigamani, 2010), qui se manifeste chez les oiseaux par une hypertrophie du rein et altère par la suite son fonctionnement (Stoev, 2004). Par ailleurs les poulets exposés à l'OTA, sont plus sensibles aux infections bactériennes et aux parasites (Koynarski et *al.*, 2007 ; Stoev et *al.*, 2002) car l'OTA déprime l'immunité humorale et la formation des anticorps (Dwivedi et Burns, 1984 ; Stoev et *al.*, 2000). Récemment, il a été montré que l'OTA provoquait en outre, des cancers du foie et des reins chez les poulets ainsi qu'une déplétion du système lymphoïde, des œdèmes et même une dégénérescence du cerveau (Stoev, 2010). Le but de la présente étude est de tester l'effet du NP1600[®] et du Mycofix[®] *in vivo* dans la prophylaxie de l'ochratoxicose chez le poulet de chair.

Cette étude vise à :

- ✓ Isoler et identifier les moisissures des grains de maïs contaminés naturellement ;
- ✓ Evaluer le pouvoir toxigène des souches isolées et leur capacité à produire les ochratoxines ;
- ✓ Etudier les effets du NP1600[®] ou du Mycofix[®] sur :
 - Les performances zootechniques des poulets de chair ;
 - Le taux d'accumulation des ochratoxines dans le foie et les reins de ces poulets.

II. Matériel et méthodes

1. Isolement et identification des moisissures du maïs

1.1 Milieu de culture

Le milieu Sabouraud fourni par Sigma a été utilisé pour l'isolement des moisissures ainsi que pour la conservation des souches, leur repiquage et leur purification.

1.2 Technique d'isolement des moisissures

La technique d'isolement des moisissures par contact direct avec la gélose a été utilisée. 10 g de grains de maïs contaminé naturellement fournie par la société SAVOB, sont broyés, puis sont mis dans un erlenmeyer stérile contenant 90 ml de NaCl 9‰. A partir de cette solution mère, des dilutions de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} sont effectuées. 100 μ l de solutions diluées sont étalées sur des boîtes de Petri en triplicate, contenant 20 ml du milieu Sabouraud.

Le dénombrement de moisissures est effectué après l'incubation de celles-ci pendant 5 jours à 25 °C. Le comptage des UFC (Unités Formant Colonies) est fait pour les boîtes contenant entre 10 et 100 UFC.

1.3 Purification et identification des isolats de moisissures obtenus

Les différents isolats de moisissures développées sur les boîtes de Pétri sont repiqués sur le milieu Sabouraud pour les maintenir en culture pure. Après l'isolement, les différentes souches obtenues sont identifiées en se basant sur des critères morphologiques d'une part, par observation macroscopique de l'aspect et de la couleur des mycéliums et d'autre part, par observation microscopique de la structure des hyphes et l'organisation de l'appareil sporifère de chaque isolat. Pour tous les isolats obtenus, l'identification des souches a été faite en se basant sur la clé de détermination établie par Pitt et *al.* (1997). Puis les souches d'*Aspergillus* section des nigri et *Penicillium* sp ont été testées pour la production des ochratoxines. Nous avons choisi ces deux moisissures car elles sont connues par leur aptitude à produire les ochratoxines.

1.4 Préparation de la suspension de spores d'*Aspergillus* section des nigri et de *Penicillium* sp

La suspension de spores d'*Aspergillus* section des nigri et de *Penicillium* sp est obtenue après croissance pendant 6 jours sur milieu Sabouraud à 25 °C. Après 6 jours, quelques spores sont détachées à l'aide d'une anse stérile, puis transférées dans un tube contenant du NaCl 0,9 % stérile. Le nombre de spores dans la suspension mère est déterminé après observation sur une

cellule de Malassez, puis la solution mère est diluée pour avoir un inoculum de l'ordre de 10^8 spores.ml⁻¹.

2. Production des ochratoxines par les isolats d'*Aspergillus* section des nigri et *Penicillium* sp

Le pouvoir toxigène des souches d'*Aspergillus* section des nigri et de *Penicillium* sp isolées, a été mis en évidence grâce à des tests de production des ochratoxines par la culture de ces moisissures sur des grains de maïs. Tout d'abord, ces grains ont été inoculés avec ces souches, puis ont été incubées à 25°C pendant 15 jours. L'extraction des ochratoxines a été réalisée à l'aide du mélange méthanol/eau (70/30). L'analyse quantitative des ochratoxines a été faite par la technique d'ELISA par compétition.

2.1 Inoculation de la farine de maïs par les spores d'*Aspergillus* section des nigri

Une quantité de 500 g de farine de maïs humidifiée avec 500 ml d'eau distillée stérile, a été répartie en 10 Erlenmeyers. Ces Erlenmeyers ont été stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 121 °C. L'inoculation de la farine de maïs stérile est réalisée par une souche d'*Aspergillus* section des nigri qui a été isolée à partir du maïs. L'inoculation est faite 24h après l'autoclavage avec 2 ml de la suspension de spores (10^8 spores.mL⁻¹) pour chaque Erlenmeyer (Ledoux, 1994). Ensuite, les différents Erlenmeyers ont été incubés à 25°C pendant 2 mois. Après l'incubation, les Erlenmeyers ont été stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 121°C et ensuite séchés à 40°C pendant 48h. Après autoclavage et séchage, les ochratoxines ont été extraites de cette farine et quantifiées selon la technique d'ELISA par compétition.

2.2 Extraction des ochratoxines à partir du maïs

La méthode d'extraction des ochratoxines utilisée est celle recommandée dans la notice d'utilisation du kit AgraQuant® ochratoxines A et B. Elle est spécifique de l'extraction des ochratoxines à partir des grains de céréales.

Après 2 mois d'incubation de la farine de maïs à 25°C, des échantillons de 20 g de cette farine prélevés ont été placés dans un récipient en verre, hermétiquement fermé, puis 100 ml de la solution d'extraction méthanol/eau (70/30 (v/v)) est ajoutée et le flacon est fermé. Les échantillons sont mixés pendant 3 minutes puis sont laissés décanter, et la couche supérieure du méthanol contenant les ochratoxines est ensuite récupérée.

2.3 Concentration de la solution des ochratoxines et leur dosage par ELISA

Le méthanol récupéré est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide dans des ballons à fond conique baignant dans un bain Marie à 45°C. La solution aqueuse contenant les

ochratoxines est récupérée puis ces ochratoxines (A et B) sont dosées par la technique d'ELISA par compétition directe.

L'analyse quantitative des ochratoxines est effectuée par la technique d'ELISA par compétition en utilisant le kit AgraQuant® ochratoxines A et B (Verdon-Delor et Raimbault, 2006). Le dosage a été effectué comme décrit précédemment (Dosage des mycotoxines par la technique d'ELISA par compétition).

3. Evaluation de l'action du NP1600® ou du Mycofix® *in vivo* dans la prophylaxie de l'ochratoxicose chez le poulet de chair

3.1 Les produits utilisés

Le **Mycofix®** est un produit utilisé dans le commerce comme étant un adsorbant des mycotoxines polaires et qui dégrade enzymatiquement les tricothécènes et la zéaralénone. Il est destiné à la volaille à une dose de 1,5 à 2,5 g par kg d'aliment. Le Mycofix® est fourni par la société Biomin.

Le **NP1600®** est un produit alternatif à base de composés naturels, développé par le laboratoire LIAV, breveté et homologué par l'ONSSA (Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires) : 2532/ONSSA/DSV/DPIV/13. Le NP 1600 est destiné à la volaille à une dose de 1 à 2 g par kg d'aliment. Il est fourni par la société LIAV (Laboratoire Industriel d'Alternatives Vétérinaires, Fès).

L'**Enramycine** est un antibiotique polypeptidique, obtenu à partir de *Streptomyces fungicidicus*. Il a une forte activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif.

3.2 Préparation du local

Avant l'arrivée des poussins, l'animalerie et le matériel d'élevage ont été désinfectés à l'eau de Javel et au détergent. Puis, chaque cage a été équipée d'un abreuvoir et de mangeoires. L'éclairage a été assuré par des ampoules de lumière blanche disposées à une hauteur de trois mètres au centre de l'animalerie en éclairage continu pendant les dix premiers jours, après lesquels, une photopériode est réglée à 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'aération et le renouvellement de l'air ont été assurés par des ventilateurs. La température de l'animalerie se situe entre 28 et 30°C. Une litière conçue pour minimiser l'humidité a été utilisée.

3.3 Animaux d'expérience

Cette expérience a été effectuée sur 60 poussins d'un jour, de la souche « Vedette JV 15 ». Ils nous ont été fournis par la société de volaille COUVNORD Fès. Le poids vif moyen initial des poussins

était de 40g. Les poussins sont élevés à l'animalerie jusqu'à l'âge de 7 jours avant le début de l'expérience, dans des conditions contrôlées, avec un accès à l'eau et à l'aliment industriel *ad libitum* tout au long de la période d'expérimentation.

3.4 Protocole expérimental

Cette expérience a été effectuée pour déterminer l'effet du NP1600® ou du Mycofix® dans la prophylaxie de l'ochratoxicose.

Les 60 poussins âgés de 7 jours sont pesés individuellement, divisés en 4 lots expérimentaux, et placés dans des cages à raison de 15 poussins par lot.

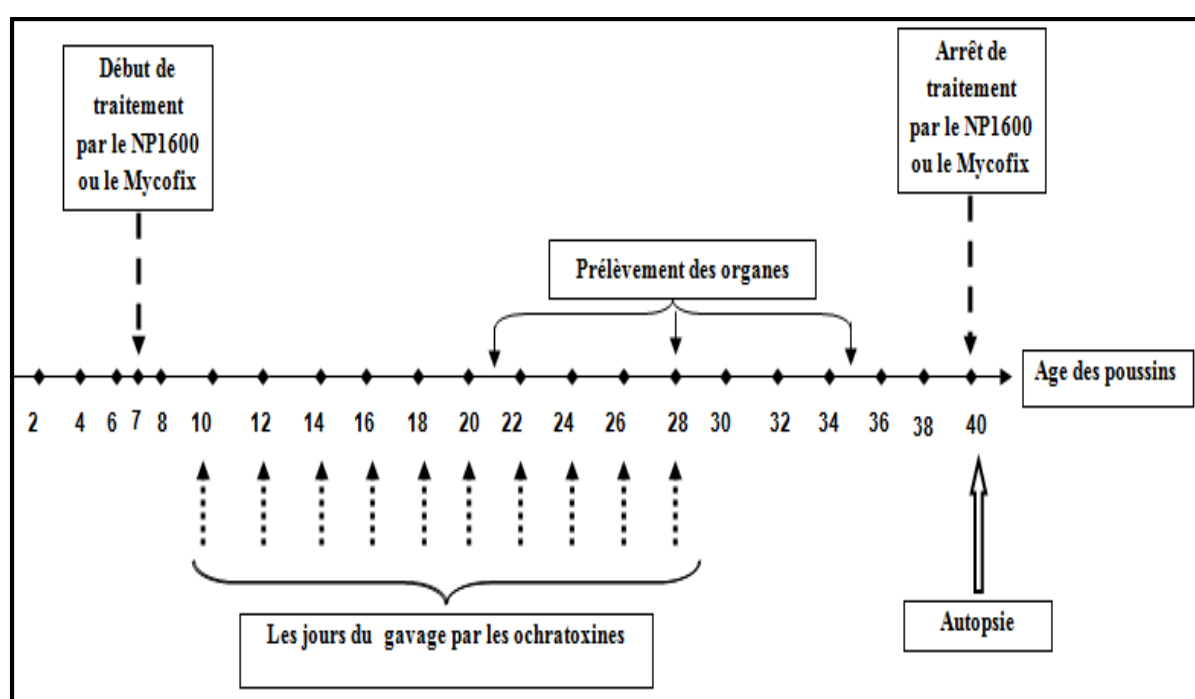


Figure 19 : Diagramme schématique du protocole expérimental

La répartition des 4 lots d'animaux a été faite comme suit :

Lot 1 : (n=15) Animaux gavés par la solution des ochratoxines, nourris avec l'aliment blanc ne contenant pas les fixateurs de mycotoxines et contenant 7 ppm d'enramycine comme promoteur de croissance. Ce lot constitue le témoin positif.

Lot 2 : (n=15) Animaux gavés par la solution des ochratoxines, un jour sur deux, nourris avec l'aliment contenant le NP1600® à la dose de 2g par Kg d'aliment à partir de J7 et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Sans enramycine

Lot 3 : (n=15) Animaux gavés par la solution des ochratoxines, nourris avec l'aliment contenant le Mycofix® à la dose de 2g par Kg d'aliment à partir de J7 et jusqu'à la fin de

l'expérimentation. 7 ppm d'enramycine sont ajoutées à l'aliment comme promoteur de croissance.

Lot 4 : (n=15) Animaux gavés à l'eau, nourris avec l'aliment non traité, ne contenant ni NP1600® ni Mycofix®. Ce lot d'animaux reçoit par ailleurs 7 ppm d'enramycine à partir de J7 et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ce lot constitue le témoin négatif.

Tous les poussins ont été gavés oralement depuis le jour J 10 un jour sur deux à 1 ml de la suspension de mycotoxines contenant 200 ppb d'ochratoxine et ceci jusqu'à 30^{ème} jour.

3.5 Détermination des paramètres zootechniques

Les paramètres zootechniques mesurés durant cette expérience sont :

3.5.1 Le poids vif moyen

Chaque lot de poussins est pesé dès le premier jour de l'expérience. Ensuite, des pesées individuelles sont effectuées à la fin de chaque semaine. Le poids vif moyen est déterminé comme suit :

$$\text{Poids vif moyen (g)} = \frac{\text{Poids de la totalité des poussins d'un lot}}{\text{Nombre de poussins de ce lot}}$$

3.5.2 Le gain du poids vif

Les poussins de chaque lot ont été pesés au début de l'expérience. Puis des pesées sont effectuées à la fin de chaque semaine, et ceci jusqu'à la fin de l'expérience. Le gain de poids est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Le gain de poids vif (g)} = \text{poids moyen final des poussins vivants} - \text{poids moyen initial de tous les poussins}$$

3.5.3 La consommation alimentaire

La consommation d'aliment (g) a été obtenue par calcul de la différence de poids de l'aliment distribué et la quantité résiduelle lors de la mesure suivante. Les résultats sont exprimés alors en g/animal/semaine.

$$\text{Consommation alimentaire (g)} = \frac{\text{Quantité d'aliment distribuée} - \text{Quantité d'aliment résiduelle}}{\text{Nombre de poussins}}$$

3.5.4 L'indice de consommation (IC)

Il correspond à la quantité d'aliment nécessaire pour produire 1 kilogramme de poids vif. L'IC est déterminé chaque semaine par la formule suivante :

IC = Quantité d'aliment consommée pendant une semaine

Gain de poids moyen de cette phase

3.5.5 Le taux de mortalité

La mortalité est notée quotidiennement. Le taux de mortalité est déterminé pour chaque lot durant chaque semaine par la formule suivante :

$$\text{Taux de mortalité (\%)} = \frac{\text{Nombre des poussins morts au cours d'une semaine} \times 100}{\text{Nombre total de poussins durant cette semaine}}$$

3.6 Prélèvement des organes

Au 21^{ème}, 28^{ème} et 35^{ème} jour de l'expérimentation, 12 animaux sont pris au hasard à raison de 3 animaux par lot, pesés et sacrifiés en vue d'évaluer l'impact des différents traitements sur le poids du foie et des reins.

3.7 Extraction des ochratoxines (OTA) à partir des foies et des reins.

L'extraction des ochratoxines est réalisée par broyage de 5g d'organe additionné à 10 ml de dichlorométhane et 7 ml d'acide citrique (1M), le mélange est mixé pendant 5 min puis agité dans un shaker horizontal pendant une heure à la température ambiante. Une centrifugation de 20 min à 4 °C, et à 3000 g, permet de séparer la phase aqueuse et la phase contenant le dichlorométhane. A l'aide d'une pipette Pasteur, la phase dichlorométhane inférieure contenant l'OTA et ses dérivés est récupérée et conservée. La phase aqueuse supérieure est à nouveau extraite avec 10 ml de dichlorométhane selon les mêmes conditions que précédemment. Après centrifugation, les phases dichlorométhane sont ajoutées l'une à l'autre. Un volume de 2 ml de la phase dichlorométhane est placé dans un tube à hémolyse, auquel sont ajoutés 2 ml de bicarbonate de sodium 1% (pH=7,7) puis agité dans un shaker horizontal pendant 30 min. Une deuxième centrifugation de 20 min, à 4 °C, et à 3000 g permet de séparer les deux phases. Un volume de 490 µl de la phase supérieure est mis dans un tube Eppendorf et 10 µl de HCl (1 N) est ajouté puis mélangé. Finalement 100 µl de cette solution est distribué dans les puits pour le dosage immunoenzymatique ELISA des ochratoxines (Biro et *al.*, 2002).

3.8 Dosage des ochratoxines par ELISA

L'analyse quantitative des ochratoxines dans les foies et les reins des poulets, est effectuée par la technique d'ELISA par compétition en utilisant le kit AgraQuant® ochratoxines A et B (Verdon-Delor et Raimbault, 2006). Le dosage a été effectué comme décrit précédemment (Dosage des mycotoxines par la technique d'ELISA par compétition).

4. Autopsie

L'autopsie est réalisée à la fin de l'expérience (le 40^{ème} jour), 3 poulets de chaque lot sont sacrifiés et l'état des différents organes (Trachée artère, Sacs aériens et abdominaux, Péricarde poumons, foie, reins, Bourse de Fabricius et intestins) est évalué.

5. Etude statistique

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne et l'écart type. La significativité des résultats est vérifiée par le test de l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph Pad Prism, version 5.03). Le seuil de signification choisi est de 5 % à $P < 0,05$.

* $P < 0,05$: Différence significative

** $P < 0,01$: Différence hautement significative

*** $P < 0,001$: Différence très hautement significative

III. Résultats

1. Identification des différents isolats de moisissures

Le tableau 15 illustre les différentes espèces constituant la flore fongique de la farine de maïs.

Malgré l'apparence saine des grains de maïs analysés, leur taux de contamination s'est révélé très élevé suite à l'observation macroscopique et microscopique des différents isolats cultivés et purifiés sur le milieu Sabouraud. Nous avons remarqué la présence d'une flore fongique diversifiée. Les résultats du tableau 15 montrent que les isolats obtenus appartiennent principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et d'autres moisissures qui n'ont pas pu être identifiées.

Les moisissures du genre *Aspergillus* représentent 51% de l'ensemble des isolats avec 52% de l'espèce *Aspergillus* section des nigri, 38% d'*Aspergillus* section des flavi et 10% d'autres espèces. Le genre *Penicillium* représente à peu près 15% de la flore fongique totale du maïs. Des moisissures du genre *Fusarium* ont également été identifiées. Elles représentent 10% de l'ensemble des isolats obtenus.

Les 24% restants sont représentés par d'autres genres de moisissures que nous n'avons pas pu identifier.

Tableau 15 : Les différentes espèces constituant la flore fongique de la farine de maïs

Genres	Pourcentage	Espèces	Pourcentages dans le genre
<i>Aspergillus</i>	51 %	<i>Aspergillus</i> section des nigri	52 %
		<i>Aspergillus</i> section des flavi	38 %
		Autres	10 %
<i>Penicillium</i>	15 %	<i>Penicillium</i> sp	100 %
<i>Fusarium</i>	10 %	<i>Fusarium</i> sp	100 %
Autres	24 %	Autres	

2. Pouvoir toxigène d'*Aspergillus* section des nigri et de *Penicillium* sp isolées

Le tableau 16 représente la production des ochratoxines par *Aspergillus* section des nigri et *Penicillium* sp sur les grains de maïs.

Afin de démontrer le pouvoir toxigène d'*Aspergillus* section des nigri et *Penicillium* sp, ces souches isolées à partir du maïs, ont été cultivées sur des grains de maïs. Les résultats du tableau 16 montrent qu'après extraction, *Aspergillus* section des nigri a un pouvoir toxigène beaucoup

plus important que celui de *Penicillium* sp. Puisqu'il a produit 230 ppb d'ochratoxines alors que *Penicillium* sp n'a produit que 11.3 ppb d'ochratoxines.

Tableau 16 : Production des ochratoxines par *Aspergillus section des nigri* et *Penicillium* sp sur les grains de maïs (ppb)

Souche	Concentration des ochratoxines en ppb
<i>Aspergillus section des nigri</i>	230 ± 12,3
<i>Penicillium</i> sp	11,3 ± 0,15

3. Dosage des mycotoxines extraites à partir de la farine de maïs

Le tableau 17 représente les concentrations des mycotoxines extraites à partir de la farine de maïs après 2 mois d'incubation. D'après les résultats du tableau 17, on remarque la présence des ochratoxines à une concentration très élevée, alors que les concentrations en toxine T2, en fumonisines, en zéaralénone, en aflatoxines et en DON sont beaucoup plus faibles par rapport aux normes maximales autorisées dans le maïs destiné à l'alimentation animale par l'Union Européenne en 2016.

Tableau 17 : Dosage des mycotoxines extraites à partir de la farine de maïs

Les Mycotoxines	La DON en ppm	Les fumonisines en ppm	Les ochratoxines en ppb	La toxine T2 en ppb	Les aflatoxines en ppb	La zéaralénone en ppb
Concentration des mycotoxines extraites du maïs	5 ± 0,5	11,22 ± 1,3	833 ± 10,7	12 ± 2,5	9,25± 2	11± 3
Teneurs maximales tolérées en mycotoxines	8	60	250	—	20	2000

4. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés aux ochratoxines

4.1 Poids vif moyen

Les résultats illustrés dans la figure 20 représentent l'évolution de poids vifs moyen des animaux durant les cinq semaines d'expérimentation.

Durant les trois premières semaines, nous n'avons pas noté de différence significative de poids vif moyen entre les différents lots.

A la fin de la 4^{ème} semaine, les poids moyens des poulets du lot ayant reçu le NP1600[®] sont plus élevés que ceux des poulets des autres lots avec une différence significative par rapport au témoin positif ($p < 0,05$).

A la fin de la 5^{ème} semaine d'âge, le NP1600[®] s'est avéré le plus efficace en terme d'amélioration du poids des poulets, avec une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin positif. Le traitement préventif au Mycofix[®] ne montre pas de différence significative du poids vif moyen entre ce lot et celui du témoin positif.

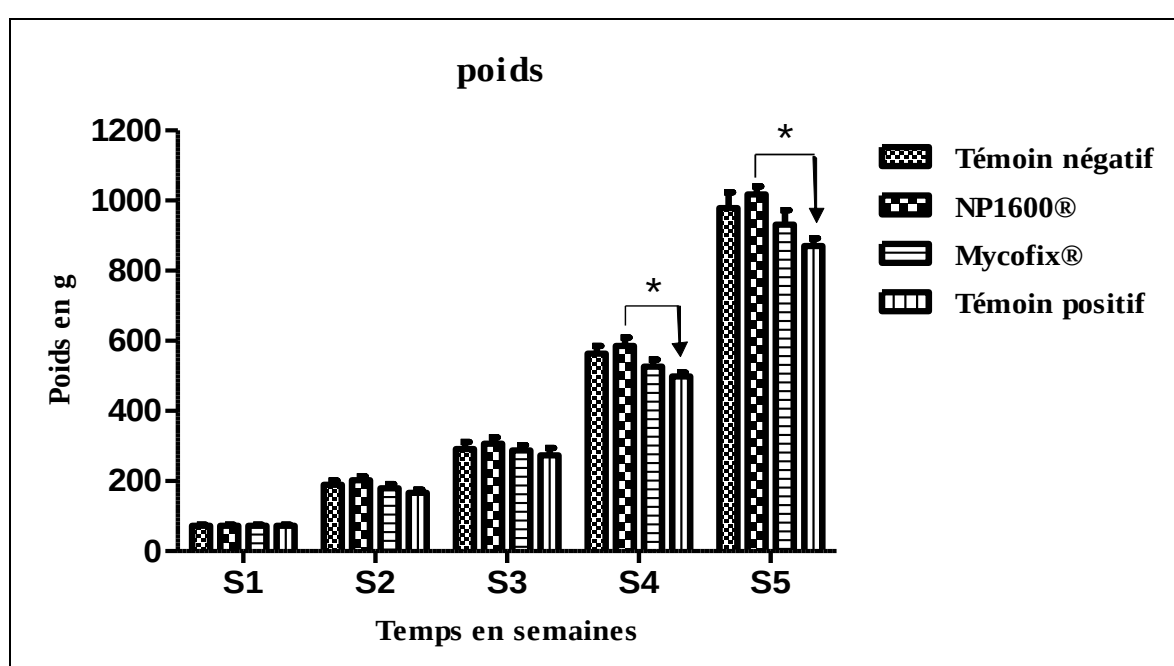


Figure 20 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur l'évolution du poids vif moyen des animaux gavés aux ochratoxines

* $P < 0,05$ comparées au témoin positif.

4.2 Gain du poids vif

Le tableau 18 illustre le gain du poids vif moyen des différents lots depuis le début de l'expérience et jusqu'à la fin.

Le meilleur gain de poids vif a été observé chez les poulets qui ont reçu le NP1600[®] (974,54g) avec une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au lot des témoins positifs. Le gain de poids vif des animaux traités au Mycofix[®] ne montre pas de différence significative par rapport au témoin positif.

Tableau 18 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur le gain de poids moyen des animaux gavés aux ochratoxines

	Poids vif moyen (g)		Gain de poids moyen (g)
	Pi (poids initial)	Pf (poids final)	
Lot Témoin négatif	42,96 ± 3,25	978,57± 44,48	935,61 ± 41,23
Lot traité au NP1600[®] dans l'aliment	42,96 ± 3,25	1017,5 ± 22,5	974,54 ± 19,25*
Lot traité au Mycofix[®]	42,96 ± 3,25	931,25 ± 41,25	888,29 ± 38
Lot Témoin positif	42,96 ± 3,25	870 ± 22,50	827,4± 19,25

* : p<0,05 comparées au témoin positif.

4.3 Taux de mortalité

Le tableau 19 représente le taux de mortalité dans les différents lots. Nous avons enregistré un taux de mortalité de 6,66 % chez le lot d'animaux infectés non traités (témoin positif). Aucune mortalité n'a été enregistré chez les animaux ayant reçu le NP1600[®] ou le Mycofix[®] durant cette période.

Tableau 19 : Mortalité enregistrée chez les poulets de différents lots

Lots	Témoin négatif	NP1600 [®]	Mycofix [®]	Témoin positif
Taux de mortalité	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,66%)

4.4 Consommation alimentaire

Les résultats représentés sur le tableau 20 montrent l'évolution de la consommation alimentaire hebdomadaire des différents lots d'animaux. Le lot d'animaux ayant consommé la plus grande quantité d'aliment durant toute la période d'expérimentation est celui traité au NP1600[®] (1926,4 g). Alors que les animaux des lots témoins positif, les animaux ayant reçu le Mycofix[®] et animaux des lots témoins négatif ont consommé une faible quantité d'aliment qui est 1745,83g, 1723,64 et 1699,37, respectivement.

Tableau 20 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la consommation alimentaire hebdomadaire des animaux gavés aux ochratoxines

<div> <div>Lots</div> <div>Semaines</div> </div>	Aliment consommé en g			
	Témoin négatif	NP1600®	Mycofix®	Témoin positif
S1	91	91	91	91
S2	157,14	171,42	148,57	157,14
S3	283,57	342,85	292,14	323,84
S4	416,66	503,63	418,18	491
S5	751	817,5	773,75	682,85
Consommation alimentaire totale en g	1699,37	1926,4	1723,64	1745,83

4.5 Indice de consommation IC

Les résultats du tableau 21 montrent l'évolution hebdomadaire des indices de consommations de différents lots. On constate une réduction de l'IC chez les poulets des lots traités aux produits (NP1600® et le Mycofix®). Cependant, une augmentation de l'IC a été constatée chez les poulets du lot témoin positif par rapport aux deux autres lots, puisqu'il est compris entre 1,67 et 3,01, alors que l'IC chez le témoin négatif ne dépasse pas 2,76.

Tableau 21: Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'indice de l'indice de consommation hebdomadaire des animaux gavés aux ochratoxines

<div> <div>Lots</div> <div>Semaines</div> </div>	Indice de consommation IC			
	Témoin négatif	NP1600®	Mycofix®	Témoin positif
S1	3,32	3,32	3,32	3,32
S2	1,34	1,32	1,38	1,67
S3	2,76	2,89	2,7	3,01
S4	1,53	1,80	1,75	2,18
S5	1,80	1,89	1,91	2,05
IC à la fin de l'expérience	1,81	1,97	1,94	2,11

A la fin de l'expérience l'IC le plus élevé a été obtenu chez les poulets du lot témoin positif, alors que les poulets des 2 lots NP1600® et Mycofix® ont des IC similaires et inférieurs que celui du lot témoin positif. L'IC des poulets du lot témoin négatif est 1,81.

5. Dosage de l'ochratoxine dans le foie et dans les reins des poulets

5.1 Les ochratoxines hépatiques

La figure 21 représente l'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans le foie des poulets gavés aux ochratoxines.

A la fin de la 3^{ème} semaine d'âge, la concentration en ochratoxines dans le foie est significativement inférieure ($p < 0.05$) chez le lot d'animaux traité au NP1600® par rapport au témoin positif. Notons par ailleurs la présence des ochratoxines dans les foies des animaux du lot témoin négatif n'ayant pas reçu d'ochratoxines.

A la 4^{ème} semaine d'âge, nous constatons une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration des ochratoxines au niveau hépatique chez le lot d'animaux traité au NP1600® et au Mycofix® par rapport au lot témoin positif.

A la 5^{ème} semaine d'âge, le traitement préventif au NP1600® s'est avéré encore plus efficace pour faire baisser la concentration des ochratoxines hépatiques, avec une différence très hautement significative ($p < 0,001$) par rapport à celle du lot des témoins positifs. Une diminution moins importante, mais significative avec ($p < 0,01$) du taux des ochratoxines hépatiques a été également constatée chez le lot traité au Mycofix®.

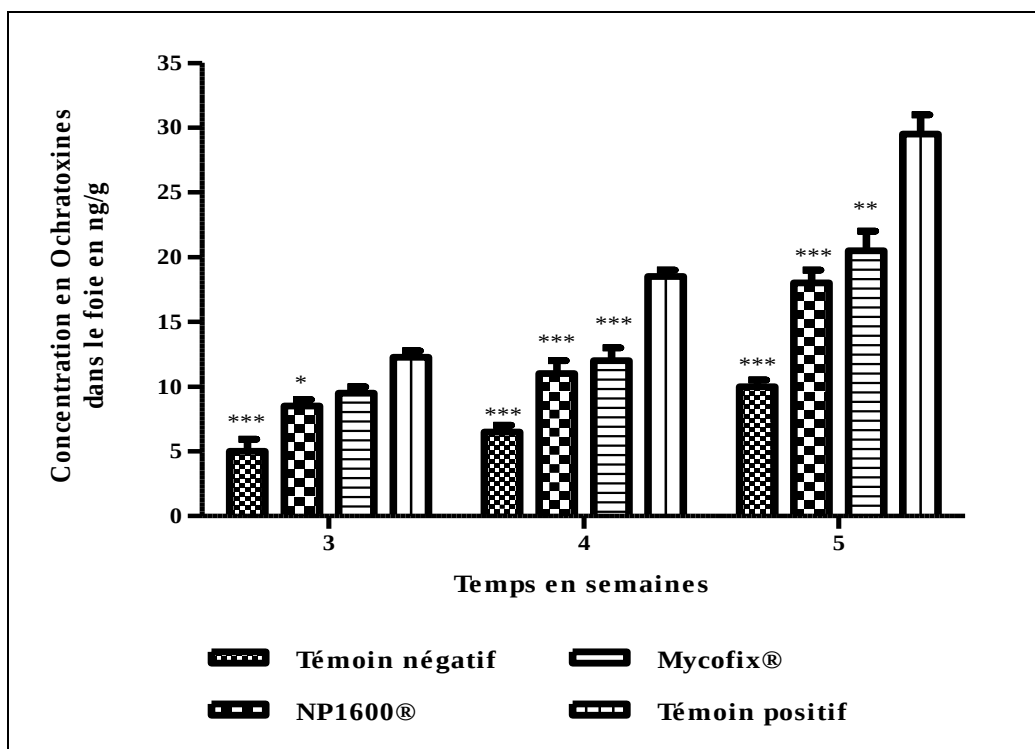


Figure 21 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration en ochratoxines dans le foie des animaux gavés aux ochratoxin

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

*** : $p < 0,001$

5.2 Dosage des ochratoxines au niveau des reins

La figure 22 représente la concentration des ochratoxines rénales des poulets des différents lots d'animaux.

A la fin de la 3^{ème} semaine d'âge, la concentration des ochratoxines dans les reins des animaux traités au NP1600® est inférieure à celle du lot des témoins positifs avec une différence significative ($p < 0,05$). La différence de la concentration des ochratoxines rénales chez les animaux traités au Mycofix® n'est pas significative par rapport aux témoins positifs.

A la 4^{ème} la 5^{ème} semaines d'âge, les lots d'animaux traités au NP1600® ou au Mycofix® ont montré une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration des ochratoxines par rapport au lot témoin positif.

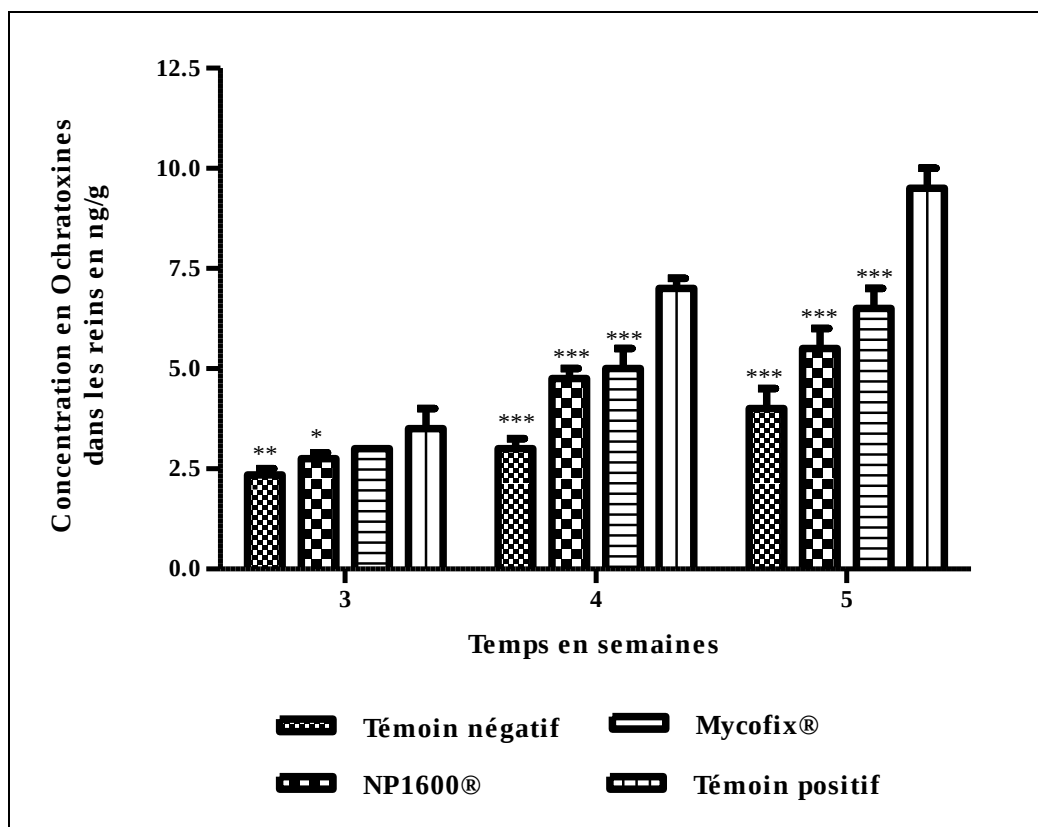


Figure 22 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines au niveau des reins d'animaux gavés aux ochratoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

*** : $p < 0,001$

6. Etude des caractéristiques des organes

6.1 Poids du foie

La figure 23 montre l'évolution des poids des foies des poulets des différents lots d'animaux à la fin de la 3^{ème}, de la 4^{ème} et de la 5^{ème} semaine d'âge. A la 3^{ème} semaine d'âge, aucune différence significative de poids des foies des animaux de différents lots n'a été enregistrée. A la 4^{ème} semaine d'âge, le poids moyen des foies de poulets du lot témoin positif est légèrement supérieur à ceux des autres lots et à la 5^{ème} semaine d'âge, une différence significative ($p < 0,05$) a été enregistrée entre le poids des foies du lot témoin positif et les lots d'animaux traités au NP1600® ou au Mycofix®.

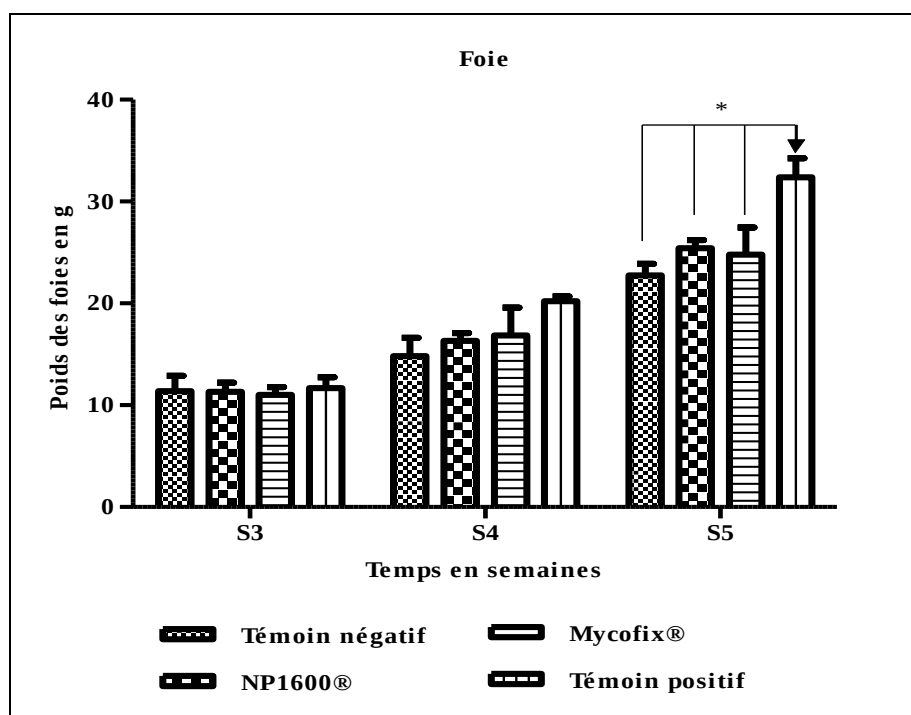


Figure 23 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids des foies des animaux gavés aux ochratoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

6.2 Poids relatif du foie

Le tableau 22 représente les résultats du poids relatif du foie. (Poids du foie x 100/ poids vif).

Le rapport poids du foie/poids vif chez le lot témoin positif est le plus élevé après les trois dernières semaines par rapport aux autres lots. Par ailleurs le poids relatif du foie chez les animaux traités au NP1600 est le plus faible.

Tableau 22 : Poids relatif du foie

Lots Semaine	Poids relatif du foie (%)			
	Témoin négatif	NP1600®	Mycofix®	Témoin positif
S3	3,93± 0,37	3,85± 0,1	3,95± 0,18	4,38± 0,08
S4	3,36± 0,13*	3,49± 0,03*	3,53± 0,15	3,61± 0,03
S5	3,32± 0,33*	3,11± 0,31**	3,7± 0,37	4,22± 0,12

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

6.3 Observation macroscopique

D'après l'examen macroscopique des foies des animaux des différents lots, nous remarquons que le foie des poulets du lot témoin positif est hypertrophié, pâle, alors que le foie des animaux ayant reçu le NP1600[®] et ceux du témoin négatif sont normaux et dans un excellent état par rapport aux autres lots. Le foie de quelques animaux qui ayant reçu le Mycofix[®] eux, ont une couleur normale avec quelques taches rouges.

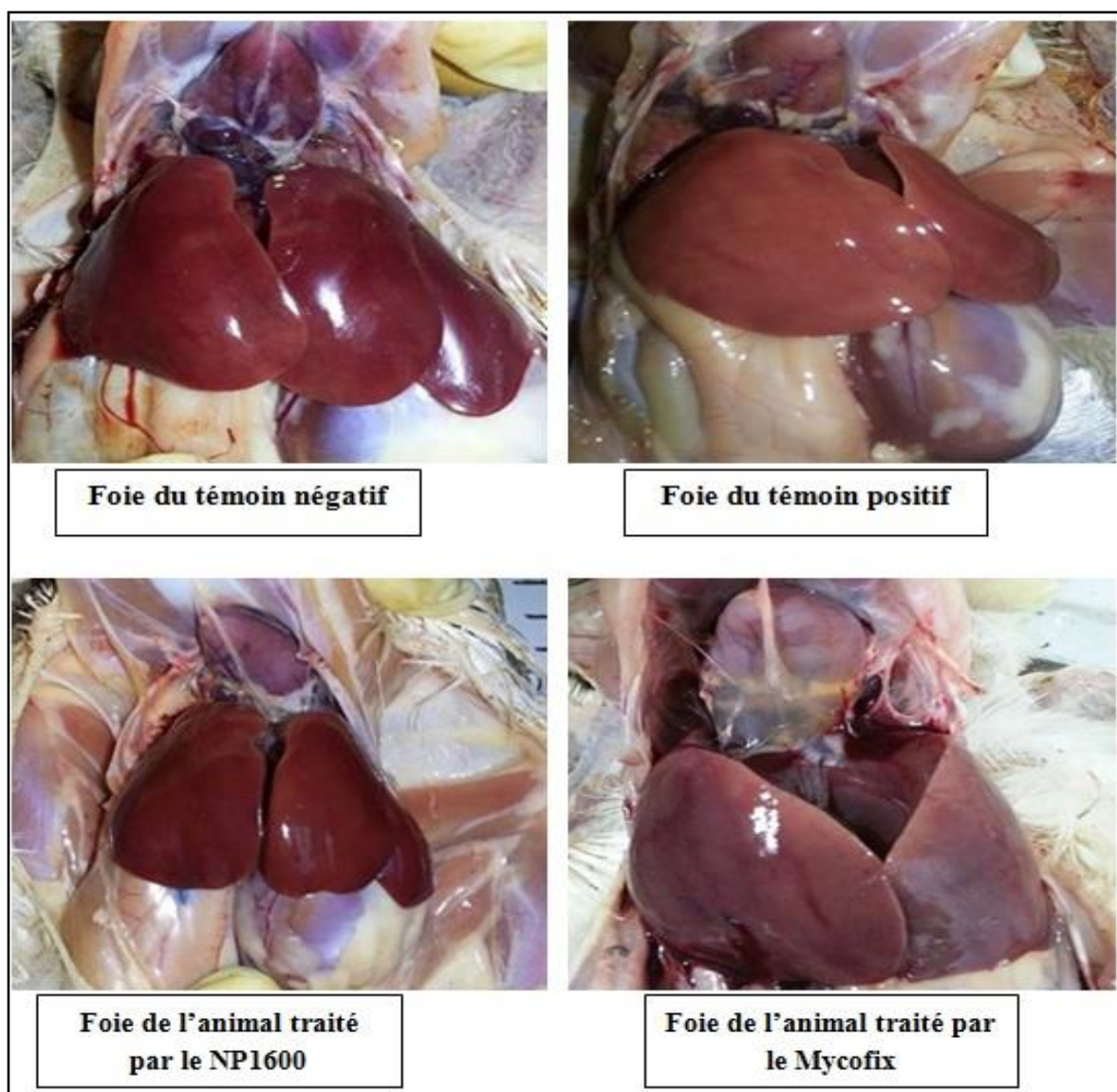


Figure 24 : *Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur les foies des animaux gavés aux ochratoxines*

6.4 Poids des reins

La figure 25 représente le poids des reins des poulets à la fin de la 3^{ème}, de la 4^{ème} et de la 5^{ème} semaine d'âge. On remarque que le poids des reins des poulets du lot témoin positif est le

plus élevé tout au long de l'expérience. A la 5^{ème} semaine d'âge le poids moyen des reins du lot traité au NP1600[®] ou au Mycofix[®] est significativement inférieur à celui du lot des témoins positifs.

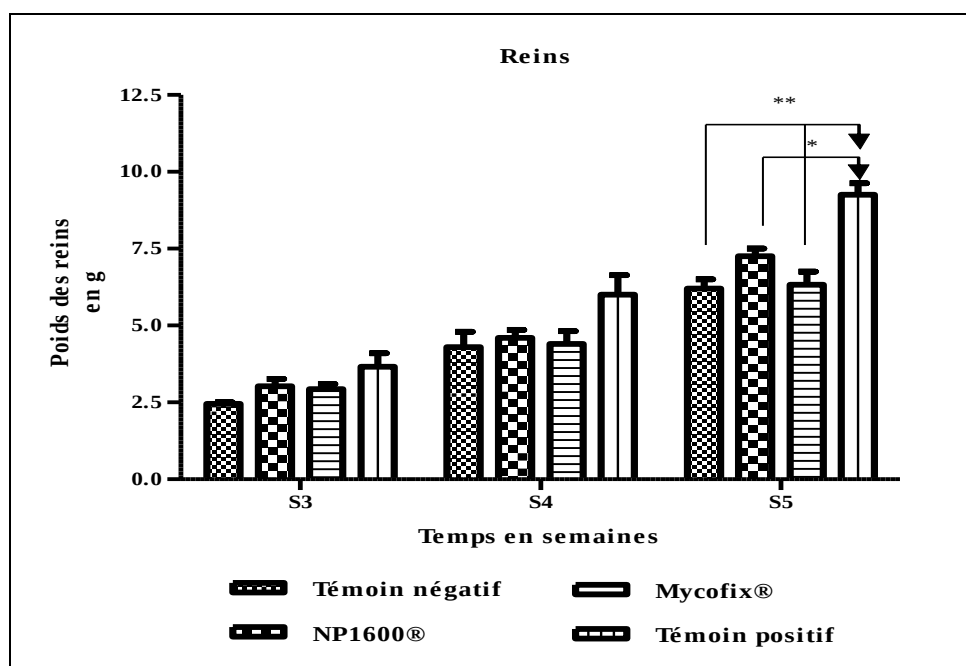


Figure 25 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur le poids moyen des reins des animaux gavés aux ochratoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

6.5 Poids relatif des reins (%)

Le tableau 23 représente les résultats du rapport reins/ le poids vif. De la même façon que pour les foies, nous remarquons que ce rapport chez le lot des témoins positifs est le plus élevé durant toute la durée de l'expérience.

Tableau 23: Poids relatif des reins

Lots Semaines	Poids relatif des reins (%)			
	Témoin négatif	NP1600 [®]	Mycofix [®]	Témoin positif
S3	0,94 ± 0,1*	1,03 ± 0,11*	1,15 ± 0,13	1,37 ± 0,13
S4	0,91 ± 0,09*	0,98 ± 0,098*	0,93 ± 0,09	1,22 ± 0,12
S5	0,9 ± 0,05*	0,89 ± 0,09*	0,94 ± 0,14	1,21 ± 0,13

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

7. Résultats des autopsies

Les résultats de l'autopsie des poulets des différents lots sacrifiés à la fin de l'expérience (40^{ème} jour) sont représentés sur le tableau 24.

Les résultats montrent que les organes des poulets du lot traité au NP1600[®] présentent un aspect normal. De plus, la trachée artère, les sacs aériens, les poumons ainsi que le péricarde des poulets de ce même lot étaient dans un bon état par rapport aux autres lots.

Tableau 24 : Résultats de l'autopsie des poulets des différents lots

	Témoin positif	NP1600[®]	Mycofix[®]	Témoin négatif
Jetages au niveau des narines	Absents	Absents	Absents	Absents
Trachée artère	Légère congestion	Normale	Normale	Normale
Sacs aériens	Opaques	Normaux	+ ou - Opaques	Normaux
Sacs abdominaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux
Péricarde	Opaque	Normal	Normal	Normal
Poumons	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux
Foie	Friable	Normal	Friable	Normal
Reins	Hypertrophiés	Normaux	Fragiles	Normaux
Bourse de Fabricius	Hypertrophiée	Normale	+ ou - Hypertrophié	Normale
Caeca digestifs	Présence de gaz	+/- Gaz	Présence de gaz	Présence de gaz

IV. Discussion

Les résultats de l'action du NP1600® sur les mycotoxines *in vitro* comparés à ceux du Mycofix et des argiles nous ont conduits à vérifier si cette efficacité du NP1600® était aussi valable *in vivo*. Le but de cette étude était dans un premier temps d'isoler et d'identifier les moisissures des grains de maïs contaminé naturellement, d'évaluer le pouvoir toxigène des souches isolées et leur capacité à produire les ochratoxines puis d'étudier les effets du NP1600® ou du Mycofix® sur les performances zootechniques des poulets de chair gavés par ces ochratoxines et d'évaluer à la fin leur taux d'accumulation dans le foie et les reins de oiseaux. Dans un premier temps, une analyse mycologique des grains de maïs importé destiné à la fabrication d'aliment composé de volaille a été effectuée. Les résultats de cette analyse ont révélé une contamination par les moisissures. La flore fongique totale des grains de maïs était constituée essentiellement de moisissures filamenteuses, très sporulantes, dotées d'un grand pouvoir de dissémination avec dominance des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Les différents genres de moisissures que nous avons pu identifier sont connus pour être des contaminants naturels des denrées alimentaires mal conservées, ils sont considérés comme des contaminants de stockage des céréales et de leurs dérivés (Berthier et Valla, 1998).

La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminante des céréales a été rapportée dans plusieurs travaux (Le Bars et *al.*, 1987 ; Riba et *al.*, 2005). Les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage (Whitlow et *al.*, 2001). Au Pakistan, Shah et *al.* (2010) ont étudié la contamination du maïs par les moisissures. Leurs résultats ont montré la présence des genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Rhizopus*. L'espèce fongique prédominante fut *Aspergillus flavus*. En Espagne, Alborch et *al.* (2012) ont étudié la contamination du maïs destiné à la consommation humaine par les moisissures. Les genres prédominants identifiés étaient *Aspergillus*, et *Penicillium*. Labuda et Tancinova (2006) ont analysé 100 échantillons d'aliment de volaille et ils ont montré que parmi les 22 genres de champignons isolés de l'aliment, *Penicillium* était le plus représenté, suivi par *Aspergillus* et par *Mucor*. L'analyse des espèces fongiques des graines de maïs montre la prédominance de l'espèce *Aspergillus* section des nigri (52%) suivi par *Aspergillus* section des flavi (38%) et de *Pénicillium* sp (45%) suivis par les espèces du genre *Fusarium* et par une multitude de moisissures de différents genres. Nos résultats sont en concordance avec les travaux réalisés par Silvério et *al.* (2010) et Visconti et *al.* (2008), qui ont montré qu'*A.niger* est parmi les moisissures de stockage les plus représentés dans les grains de maïs stockés. Cette fréquence de contamination importante est accompagnée aussi par une production de mycotoxines.

Du point de vue mycotoxicologique, les deux espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* isolées purifiées et identifiées sont potentiellement toxigènes (Lemke et al., 1989). Certaines espèces de ces deux sont réputées par leur production de mycotoxines et particulièrement les ochratoxines. L'ochratoxine est considérée comme l'une des mycotoxines les plus dangereuses et les plus fréquemment impliquées dans les mycotoxicoses (Leeson et al., 1995). L'ochratoxine A est une mycotoxine qui provoque beaucoup d'effets néfastes chez les humains et les animaux domestiques. Cette mycotoxine peut causer des pertes de production subaiguës et chroniques chez les volailles (Khatoon et Abidin, 2018). L'Ochratoxine A semble produire ses effets toxiques par l'un des trois mécanismes : inhibition des enzymes du métabolisme phénylalanine, de la promotion de la peroxydation lipidique, ou l'inhibition de la production d'ATP mitochondriale (Fink-Gremmels, 1999). L'ochratoxine A est préoccupante car il y a un risque élevé qu'elle soit produite dans les aliments entreposés, elle a été détectée dans le sang des volailles et c'est un puissant carcinogène (groupe 2b) et néphrotoxique (IARC, 1993).

Pour cela, nous nous sommes limités à cette mycotoxine dans cette première expérience *in vivo*. Nous avons alors isolé des souches purifiées d'*Aspergillus* section des nigri et *Penicillium* sp. Et nous les avons mises en contact avec des grains entiers de maïs pendant 15 jours. Les résultats du dosage des ochratoxines montrent que dans nos conditions expérimentales, la souche d'*Aspergillus* section des nigri a produit beaucoup plus d'ochratoxines que la souche de *Penicillium* sp. Selon Alborch et al. (2011), les souches d'*A. Niger* et *A. carbonarius* ont pu produire de l'OTA sur les grains de maïs à partir du 5^{ème} jour d'incubation sur une large plage de températures et d'humidité. Pour cette raison, nous avons décidé d'utiliser cette souche d'*A.spergillus* section des nigri dans le maïs et de laisser en incubation pendant 60 jours pour obtenir la plus forte teneur possible en ochratoxines.

Les ochratoxines produites dans ces conditions ont été dosées. Le résultat du dosage montre la présence d'une très forte teneur en ochratoxines (833 ppb). Elle est 4 fois supérieure à la teneur maximale autorisée dans le maïs destiné à l'alimentation animale par l'Union Européenne en 2016. Les autres mycotoxines étaient présentes à des teneurs plus faibles que la teneur maximale tolérée par la norme de l'Union Européenne en 2016. Ces ochratoxines ont servi pour provoquer une ochratoxicose expérimentale chez les poussins dans le but de tester et de comparer l'action du Mycofix[®] et du NP1600[®] *in vivo*.

1. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés aux ochratoxines

Cette expérience a été menée sur des poussins d'un jour. A l'âge de 7 jours ces animaux ont été traités d'une façon préventive avec du NP1600® ou avec du Mycofix® (lot de 15 poussins) introduits dans l'aliment pendant toute l'expérience. A l'âge de 10 jours, les lots d'animaux témoins positifs, traités au NP1600® ou au Mycofix® ont été gavés par les ochratoxines. Le lot d'animaux n'ayant pas reçu les ochratoxines a servi de témoin négatif.

Puisqu'il est connu que les ochratoxines ont une influence sur le poids, il fallait vérifier s'il y avait une différence entre le lot témoin négatif n'ayant pas reçu d'ochratoxines et le lot témoin positif gavé par les ochratoxines.

Dès que nous avons commencé le gavage des animaux par les ochratoxines, nous avons constaté un retard de croissance chez le lot témoin positif par rapport au témoin négatif malgré sa prise alimentaire qui était supérieure à celle du témoin négatif. Ceci nous permet de considérer que l'ochratoxicose que nous avons essayé de provoquer, s'exprime par un retard de croissance qui se traduit par un faible poids et un faible gain de poids et par un indice de consommation élevé. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Kubena *et al.*, (1988); Stoev *et al.* (2000); Verma *et al.* (2004); Koynarski *et al.* (2007) ; Khatoon *et al.*, (2016) qui ont montré que l'OTA provoque l'altération des paramètres zootechniques. Les études de Pohlen *et al.*, (1992); Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, (1999); Pfohl-Leszkowicz *et al.* (2002) ont montré que l'effet délétère des mycotoxines sur différents organes tels que, les intestins, conduit à une mauvaise rétention des éléments nutritifs au niveau de l'épithélium intestinal et par conséquent une diminution du poids corporel. Donc dans nos conditions expérimentales, nous pouvons évaluer l'efficacité du Mycofix® et du NP1600® et les comparer.

Les résultats des paramètres zootechniques montrent que le Mycofix® permet d'améliorer légèrement ces paramètres mesurés mais ces paramètres restent inférieurs à ceux du témoin négatif. Ce qui signifie que le Mycofix® à la dose utilisée (2 g.kg⁻¹ d'aliment) est incapable d'empêcher totalement l'action négative de l'ochratoxine. Lorsqu'on analyse ces mêmes paramètres chez le lot ayant reçu le NP1600®, on remarque que le poids et le gain de poids de ce lot sont significativement meilleurs que ceux du lot témoin positif et légèrement mieux que ceux du lot témoin négatif qui n'a pas reçu d'ochratoxines par gavage. Donc le NP1600® utilisé à la dose de 2 g.kg⁻¹ d'aliment est capable d'empêcher l'apparition des effets négatifs des ochratoxines sur les performances zootechniques (poids, consommation alimentaire, indice de consommation...).

2. L'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans les foies et les reins des animaux gavés aux ochratoxines

Au-delà des paramètres zootechniques, nous avons réalisé des dosages de mycotoxines accumulées dans le tissu hépatique et dans les reins de 3 animaux prélevés au hasard dans chaque lot à la fin de la 3^{ème}, de la 4^{ème} et de la 5^{ème} semaines d'âge. Les résultats montrent que les animaux du lot témoin positif ont une charge en ochratoxines hépatique qui est significativement supérieure à celle du lot témoin négatif. Les animaux ayant reçu le NP1600® présentent une teneur en ochratoxines très significativement inférieure à celle du témoin positif et presque identique à celle du témoin négatif. Les animaux du lot Mycofix®, eux présentent une teneur en ochratoxines significativement inférieure à celle du témoin positif. Néanmoins, elle reste supérieure à celle du lot NP1600®.

Au niveau rénal, le dosage des ochratoxines montre une différence significative entre les animaux du lot témoin positif et ceux du lot témoin négatif, ce qui confirme la fiabilité de notre modèle expérimental. Une différence significative entre le lot de témoins positifs et celui des animaux traités au NP1600® et au Mycofix® a été mise en évidence au bout de la 5^{ème} semaine. Enfin l'OTA est connue pour avoir une action toxique (Stoev et *al.*, 2000) et le pouvoir de s'accumuler dans ces deux organes (Biro et *al.*, 2002).

3. L'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids relatif des foies et des reins des animaux

La différence observée au niveau de la teneur en ochratoxines du tissu hépatique se traduit par une hypertrophie du foie qui se répercute sur le poids relatif des foies élevé (Joo, 2013).

L'augmentation du poids relatif des reins et du foie des animaux gavés à l'OTA chez le lot de témoin positif est en accord avec plusieurs études. Ces études ont montré que l'administration de l'OTA à différentes doses aux poulets, provoque l'augmentation du poids relatifs de ces organes (Dwivedi et Burns, 1984 ; Huff et *al.*, 1988 ; Santin et *al.*, 2002 ; Stoev et *al.*, 2000 et 2004 ; Elaroussi et *al.*, 2006 ; Khatoon, 2016 ; Qu et *al.*, 2017). Les hypertrophies du foie et des reins dans les groupes d'animaux ayant reçu l'ochratoxine seraient probablement dues au fait que ces organes sont impliqués dans la métabolisation ou / et l'élimination des substances toxiques de l'organisme si bien que l'augmentation de leur taille pourrait résulter des dommages causés au cours de l'élimination de l'OTA du corps par les reins et le foie (Fuchs et *al.*, 1988).

Le lot traité au Mycofix® présente un poids relatif du foie dont la valeur est intermédiaire entre celle du lot témoin positif et celle du lot témoin négatif. Ce qui signifie que le Mycofix® atténue

légèrement l'ochratoxicose. Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Hanif et *al.* (2008) qui ont montré que l'utilisation de 2 g.kg⁻¹ de Mycofix® Plus permet d'atténuer l'effet de l'incorporation de 1 mg.kg⁻¹ d'OTA chez les poulets. Le poids relatif du foie du lot d'animaux traités au NP1600® est légèrement inférieur à celui du témoin négatif, ceci signifie que le NP1600® arrive à empêcher les effets négatifs de l'ochratoxicose. L'ensemble des résultats obtenus, concernant l'accumulation des ochratoxines dans les organes filtres (foie et reins) et le niveau de l'hypertrophie de ces deux organes nous permet de dire que si le Mycofix® est capable d'atténuer les effets de l'ochratoxicose expérimentale que nous avons provoquée, le NP1600® est capable d'exercer un effet protecteur largement supérieur à celui du Mycofix®. Dans ce contexte, une étude menée par Khatoon et *al.* (2016), a montré que l'administration de 0,15 ; 0,3 ou 1 mg.kg⁻¹ d'OTA dans l'alimentation de poulet a provoqué une décoloration, une friabilité et une hypertrophie des foies et un ballonnement des reins. Ces lésions ont déjà été observées par de nombreux chercheurs (Elaroussi et *al.*, 2006 ; Hanif et *al.*, 2008).

En conclusion, les résultats de ce test *in vivo* montrent que le Mycofix® mélangé avec l'aliment à 2 g.kg⁻¹ est capable d'atténuer l'impact négatif de l'ochratoxicose. Les résultats de ce test *in vivo* permettent de conclure que le NP1600® mélangé avec l'aliment à 2 g.kg⁻¹ est capable d'empêcher les ochratoxines d'exercer un impact négatif sur le poids relatif des organes filtres (foie et rein) et sur les paramètres zootechniques. On peut expliquer la supériorité de l'action du NP1600® par rapport au Mycofix®, par la différence de composition des deux produits. Le Mycofix® est constitué d'argiles et de parois de levures et d'enzymes conçus pour lutter exclusivement contre les mycotoxines en les adsorbant afin de les empêcher de traverser la barrière intestinale. En revanche le NP1600® est constitué d'argiles activées par l'intercalation des huiles essentielles entre leurs feuillets. Ces argiles, une fois dans l'intestin vont absorber l'eau et les mycotoxines et libérer les huiles essentielles. Ces HE ainsi libérées vont d'abord agir sur la flore intestinale pour la réduire et exercer ainsi une activité antimicrobienne. Après absorption intestinale, ces HE vont passer dans la circulation sanguine, puis seront éliminés par voie urinaire (rénale), biliaire (hépatique) et respiratoire (poumons). C'est ainsi que les HE vont réduire la charge microbienne accrue au niveau intestinal, pulmonaire, rénal et hépatique en cas de passage des microbes dans la circulation. Les HE ainsi distribuées dans tous l'organisme de l'animal vont assurer une intégrité des organes clés de l'organisme animal qui sont les intestins, le foie, les reins et les poumons. En conclusion, on peut dire que si le NP 1600 et le Mycofix® sont comparables en tant que fixateurs de mycotoxines, le NP1600® possède une supériorité d'action due aux HE que le Mycofix® ne possède pas.

V. Conclusion

La contamination des denrées alimentaires par les moisissures peut entraîner des conséquences telles que l'altération des propriétés organoleptiques et la diminution de la valeur nutritive des aliments ainsi que l'accumulation des mycotoxines qui ont des effets néfastes pour l'animal et le consommateur.

- Les résultats de l'analyse mycologique du maïs ont révélé la dominance des espèces qui appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.
- Les résultats de l'analyse mycotoxicologique montrent qu'*Aspergillus* section des nigri est capable de produire les ochratoxines.
- Le NP1600[®] ou le Mycofix[®] permet d'améliorer en traitement préventif (2 g.kg⁻¹ d'aliment), les paramètres zootechniques des poulets gavés aux ochratoxines produites par qu'*Aspergillus* section des nigri. Avec une supériorité d'action du NP1600[®].
- Le traitement prophylactique au Mycofix[®] ou au NP1600[®] réduit le taux de l'accumulation de résidus des ochratoxines dans le foie et les reins.

Cette évaluation de l'action protectrice du NP1600[®] ou du Mycofix[®] contre les effets délétères des ochratoxines est considérée comme un test préclinique très prometteur. Pour cela, nous avons jugé nécessaire de tester ces mêmes produits dans le cas d'une contamination multiple par les mycotoxines.

Chapitre II : Evaluation de l'effet du NP1600® ou du Mycofix® *in vivo* dans la prophylaxie des mycotoxicoses chez le poulet de chair

I. Introduction

Dans les pays en voie de développement, l'aviculture est une activité en plein essor et son importance varie d'un pays à l'autre. Selon le Réseau International pour le Développement de l'Aviculture Familiale RIDAF (2004), l'élevage du poulet est universellement accepté comme étant une agro-industrie à grande et petite échelle à cycle court. Elle est génératrice de revenus et d'emplois du fait de la qualité nutritionnelle exceptionnelle des produits riches en protéines, et de faible coût. Cependant, le secteur avicole est confronté à plusieurs menaces parmi lesquelles, les infections bactériennes, parasitaires et virales, qui s'attaquent aux animaux d'élevage, ainsi que les mycotoxines produites par les moisissures et les endotoxines bactériennes potentiellement présentes dans l'aliment. Dans le domaine de la nutrition avicole, les mycotoxines représentent un danger important, car elles peuvent contaminer les aliments et provoquer ainsi des intoxications chez les animaux d'élevage et par conséquent chez le consommateur.

L'aliment peut être un substrat pour le développement de moisissures qui, souvent, sous certaines conditions d'humidité, peuvent produire des mycotoxines (Jard, 2009). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produites par une grande variété de moisissures principalement des genres *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* (Betina, 1994). Les moisissures se développent sur différents types d'aliments bruts tels que les céréales, les oléoprotéagineux et les fourrages et ceci dans des situations écologiques très diverses (AFSSA, 2009).

De par leur grande stabilité thermique, les mycotoxines sont capables de provoquer une réponse toxique lorsqu'elles sont ingérées, inhalées ou absorbées par la peau des animaux ou des humains. Elles peuvent avoir des activités mutagènes, cancérogènes, tératogènes, immunotoxinogènes, et peuvent également jouer le rôle de perturbateurs endocriniens (Pfohl Leszkowicz, 2002). Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et leur lipophilie en font des toxines capables de persister dans l'organisme.

L'objectif général de ce travail est d'évaluer l'efficacité *in vivo* chez les poulets de chair, du NP1600® et du Mycofix® dans la prophylaxie de la mycotoxicose. Cette étude vise à étudier les effets de ces deux produits sur :

- Les performances zootechniques des poulets de chair.
- Le taux d'accumulation des ochratoxines dans les foies et les reins des poulets.

- Les paramètres biochimiques du sang.

II. Matériel et méthodes

1. Les produits utilisés

- Le **NP1600**[®] est fourni par la société LIAV (Laboratoire Industriel d'Alternatives Vétérinaires, Fès).
- Le **Mycofix**[®] est fourni par la société Biomin.
- L'**Enramycine** est fournie par la société SAVOB.

2. Préparation de la solution de mycotoxines

Un échantillon de 1 kg de la farine de l'aliment composé de volaille a été utilisé, auquel 5% d'eau stérile a été ajoutée afin d'augmenter l'humidité et favoriser la croissance des champignons. Cette farine a été incubée, dans une étuve à 25°C pendant 3 mois (figure 26).



Figure 26 : *Farine de l'aliment composé de volaille après 3 mois d'incubation*

2.1 Extraction des mycotoxines à partir de l'aliment composé de volaille

Pour l'extraction des mycotoxines à partir de l'aliment composé de volaille, la méthode utilisée est celle recommandée dans la notice d'utilisation des kits "AgraQuant[®] Aflatoxines totales, AgraQuant[®] Deoxynivalenol (DON), AgraQuant[®] Fumonisines totales, AgraQuant[®] ochratoxines A et B et AgraQuant[®] toxine T2.". Elle est spécifique de l'extraction des mycotoxines à partir des grains de céréales.

Les échantillons de 20 g de la farine de l'aliment composé incubés pendant 3 mois ont été prélevés et placés dans un récipient en verre, hermétiquement fermé, puis 100 ml de la solution d'extraction méthanol/eau (70/30 (v/v)) est ajoutée et le flacon est fermé. Les échantillons sont

mixés pendant 3 minutes puis laissés décanter, et la couche supérieure du méthanol de l'extrait est ensuite récupérée.

2.2 Concentration de la solution de mycotoxines

Le méthanol récupéré est évaporé par un évaporateur rotatif sous vide dans des ballons à fond conique baignant dans un bain Marie à 45°C. La solution aqueuse contenant les mycotoxines est récupérée et les mycotoxines qui sont la DON, les aflatoxines totales (B1, B2, G1 et G2), la toxine T2, les fumonisines totales (B1, B2 et B3) et les ochratoxines (A et B) sont dosées par la technique d'ELISA par compétition directe.

2.3 Dosage des mycotoxines dans les échantillons de l'aliment composé par la technique d'ELISA par compétition

L'analyse quantitative des mycotoxines qui sont la DON, la Toxine T2, les Aflatoxines totales, les ochratoxines et les fumonisines totales, contenus dans les échantillons de l'aliment composé, a été effectuée par la technique d'ELISA par compétition en utilisant les kits (Verdon-Delor et Raimbault, 2006).

Des quantités de 200 µl de mycotoxines conjuguées lié à la peroxydase (fournis avec le kit) sont distribuées dans les puits de plaques de microtitration, puis 100 µl de standard et d'échantillons à doser sont rajoutés à chaque puits coloré de dilution. Ensuite 100 µl de ce mélange sont transférés dans les puits recouverts d'anticorps. La plaque est incubée pendant 5 à 20 minutes (selon les kits) à la température ambiante. Après incubation, chaque puits de la plaque est alors lavé 5 fois à l'eau désionisée ou avec une solution tampon. La révélation de l'anticorps lié à l'antigène fixé sur la plaque est réalisée par l'addition de 100 µl de substrat chromogénique à chaque puits. L'ensemble est mélangé doucement et incubé pendant 5 min à la température ambiante à l'obscurité. 100 µl du réactif stop est ajouté par la suite dans chacun des puits. Les micro-puits sont ensuite analysés par spectrophotomètre à l'aide du lecteur de microplaque Stat Fax, ayant un filtre d'absorbance de 450 nm et un filtre différentiel de 630 nm, dont l'absorbance est inversement proportionnelle à la concentration de la mycotoxine contenue dans l'échantillon. Les absorbances des échantillons sont comparées à celles des standards et un résultat permettant l'interprétation est ainsi fourni avec le kit.

3. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés par les mycotoxines

3.1 Matériel animal

Cette expérience a été effectuée sur 60 poussins jaunes âgés de 1 jour, de souche « Vedette JV 15 », fournis par la société de volaille COUVNORD Fès, et dont le poids vif moyen est de 37g. Avant le placement des poussins, l'animalerie et les cages ont été soigneusement nettoyées et désinfectées. Les poussins sont élevés à l'animalerie jusqu'à l'âge de 7 jours avant le début de l'expérience, dans des conditions contrôlées de température d'environ $29 \pm 1^\circ\text{C}$, en éclairage continu pendant les dix premiers jours, après lesquels, une photopériode est réglée à 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Avec l'accès à l'eau et à l'aliment industriel *ad libitum* tout au long de la période d'expérimentation (voir composition de l'aliment en annexe), le renouvellement de l'air est assuré par un ventilateur.

3.2 Protocole expérimental

Cette expérience a été effectuée pour déterminer l'effet de NP1600® ou de Mycofix® pour le traitement prophylactique de la mycotoxicose.

Les 60 poussins âgés de 7 jours sont pesés individuellement, divisés en 4 lots expérimentaux de poids appariés, et placés dans des cages séparées à raison de 15 poussins par lot (figure 27).

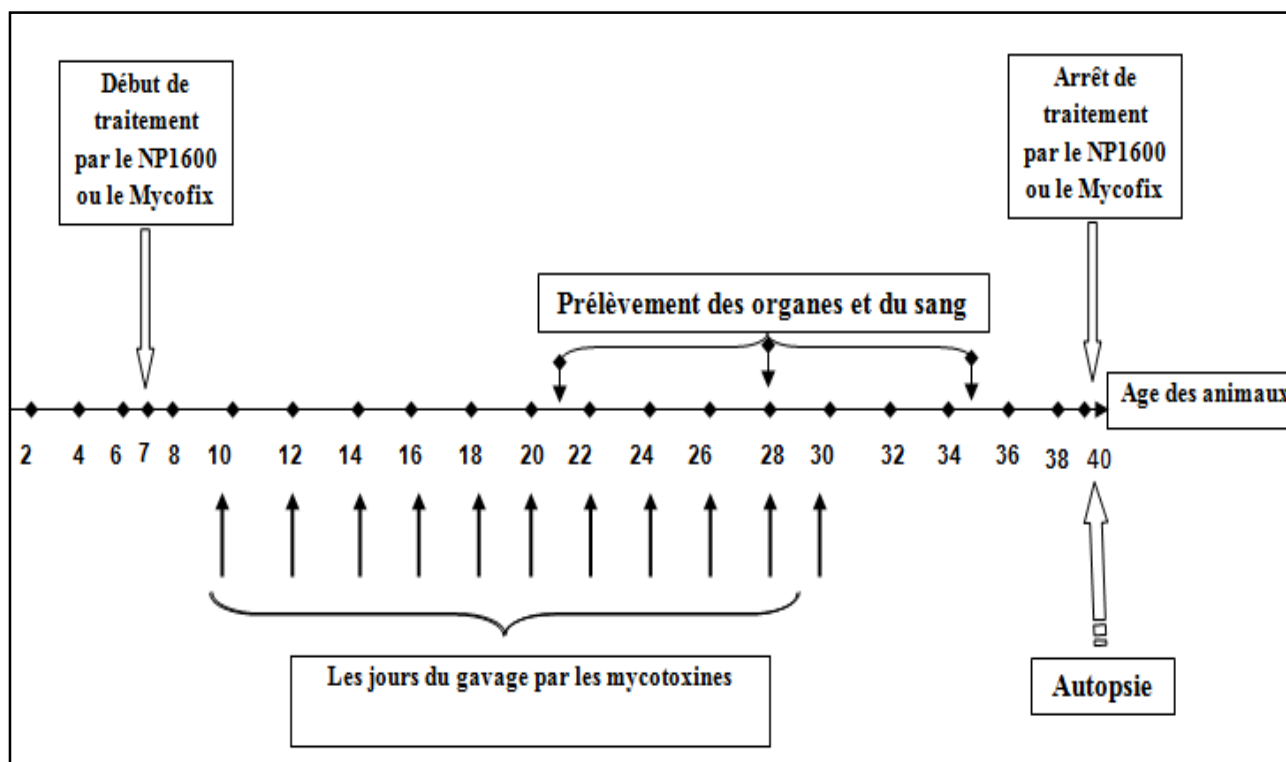


Figure 27 : Diagramme schématisé du Protocole expérimental

La répartition des 4 lots d'animaux est faite comme suit :

Lot 1 : (n=15) Animaux gavés par la solution de mycotoxines à partir du J10 et jusqu'à J30, un jour sur deux, nourris avec l'aliment blanc et contenant 7 ppm d'enramycine. Ce lot constitue le témoin positif.

Lot 2 : (n=15) Animaux gavés par 1 ml de la solution de mycotoxines à partir du J10 et jusqu'à J30, un jour sur deux. Ces animaux sont nourris avec l'aliment contenant le NP1600® à la dose de 2g par Kg d'aliment dès J7 et jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Lot 3 : (n=15) Animaux gavés par la solution de mycotoxines à partir du J10 et jusqu'à J30, un jour sur deux. Ce lot d'animaux est nourri avec l'aliment contenant le Mycofix® à la dose de 2g par Kg d'aliment et 7 ppm de l'enramycine à partir de J7 et jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Lot 4 : (n=15) Animaux nourris avec l'aliment non traité (aliment blanc), ne contenant ni NP1600® ni Mycofix®. Ces animaux reçoivent par ailleurs 7 ppm d'enramycine à partir de J7 et jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ce lot constitue le témoin négatif.

Le gavage des animaux par les mycotoxines se fait le matin par voie orale à l'aide d'une micropipette contenant 1 ml de la suspension de mycotoxines et ceci jusqu'à 30^{ème} jour.

3.3 Détermination des paramètres zootechniques

Les principaux paramètres zootechniques mesurés durant cette expérience sont : le poids vif moyen, le gain de poids, la consommation alimentaire, l'indice de consommation et le taux de mortalité.

3.4 Prélèvement et étude des caractéristiques des organes

Au 21^{ème}, 28^{ème} et 35^{ème} jours de l'expérimentation, 12 animaux sont prélevés au hasard à raison de 3 animaux par lot, pesés et sacrifiés en vue d'évaluer l'impact des différents traitements sur le poids des foies et des reins. Ensuite, le dosage des mycotoxines dans ces organes a été réalisé par la technique d'ELISA par compétition directe.

3.5 Poids relatif des organes

Le poids relatif des organes ou le rapport poids de l'organe/ poids de l'animal est calculé selon la formule suivante :

Le poids relatif = (poids de l'organe / poids de l'animal) X 100

3.6 Extraction des ochratoxines (OTA) à partir des foies et des reins.

L'extraction des ochratoxines à partir des foies et des reins a été réalisée comme décrit précédemment, et selon la méthode décrite par Biro et *al.* (2002).

3.7 Dosage des ochratoxines par ELISA

L'analyse quantitative des ochratoxines dans les foies et les reins des poulets, est effectuée par la technique d'ELISA par compétition en utilisant le kit AgraQuant® ochratoxines A et B (Verdon-Delor et Raimbault, 2006). Le dosage a été effectué comme décrit dans le chapitre précédent.

4. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres biochimiques des animaux gavés aux mycotoxines

4.1 Prélèvement des échantillons de sang

Au 21^{ème}, 28^{ème} et 35^{ème} jours de l'expérimentation, 12 animaux sont prélevés au hasard à raison de 3 animaux par lot, pesés et sacrifiés et le sang est recueilli dans des tubes secs pour l'étude des paramètres biologiques. Le sang est centrifugé et le sérum est aliquoté et conservé à - 20 °C jusqu'au moment des analyses.

4.2 Analyse de quelques paramètres biochimiques

Les analyses biochimiques des sérums des poulets ont été effectuées dans le laboratoire. Elles ont concerné des marqueurs tels que le taux des protéines totales, le cholestérol, la créatinine, les triglycérides, l'urée et l'acide urique ainsi que les enzymes hépatiques ASAT et ALAT. Toutes les analyses biochimiques ont été effectuées avec des kits commerciaux (BIOSYSTEMS®, France), selon les spécifications du fabricant. Les dosages étaient colorimétriques et les lectures d'absorbance ont été faites à l'aide du spectrophotomètre BTS 310 (BIOSYSTEMS®, France).

4.2.1 Principe du dosage des Protéines totales

Le dosage des protéines totales du sérum se fait selon la réaction de Biuret. Les protéines présentes dans l'échantillon réagissent avec les ions cuivre II (Cu^{2+}) en milieu alcalin, pour donner un complexe de couleur violette quantifiable par spectrophotométrie à 545 nm.

4.2.2 Principe du dosage de l'urée

C'est la méthode à l'uréase. On procède à une décarboxylation de l'urée présente dans le sang à l'aide d'une enzyme spécifique de l'urée en milieu aqueux appelée uréase. L'action du mélange

de salicylate et de l'hypochlorite de sodium sur l'ion ammonium formé en présence de nitroprussiate conduit à un indophénol de couleur verte quantifiable par spectrophotométrie à 600 nm.

4.2.3 Principe du dosage de la créatinine

La créatinine est dosée en routine par la réaction de Jaffé (Guder et *al.*, 1986). La créatinine réagit avec le picrate en milieu alcalin, pour donner un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie à 500 nm.

4.2.4 Principe du dosage des enzymes hépatiques

Pour déterminer l'activité d'une enzyme, on utilise la réaction catalysée par l'enzyme et l'on dose la quantité de produit formé ou la quantité de substrat détruit au cours d'un temps déterminé. Les activités enzymatiques de l'ALAT et de l'ASAT ont été déterminées en utilisant les réactions couplées de la lactate-déshydrogénase (LDH) et de la malate-déshydrogénase (MDH), respectivement à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesurées à 340 nm au spectrophotomètre.

4.2.5 Principe du dosage du cholestérol

Le cholestérol a été dosé par une méthode enzymatique utilisant la cholestérol estérase et la cholestérol oxydase. Dans une première étape les esters de cholestérol sont hydrolysés en cholestérol libre par l'estérase puis le cholestérol libre est oxydé en cholesténone avec production d'eau oxygénée. La lecture de l'échantillon est réalisée à 540 nm.

4.2.6 Principe du dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique est un dosage enzymatique colorimétrique. L'acide urique est converti par l'uricase en allantoïne et en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sous l'action catalytique de la peroxydase, oxyde l'acide 3-5-dichloro-2-hydroxybenzène sulfonique et l'aminophénazone pour former un complexe quinonéimine rouge violet. La lecture de l'échantillon est réalisée à 520 nm.

4.2.7 Principe du dosage des triglycérides

Les triglycérides présents dans l'échantillon sérique donnent après hydrolyse enzymatique et oxydation un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie. L'indicateur, la quinonéimine, est formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du 4-amino-antipyrine et du chlorophénol sous l'action de la peroxydase. La lecture se fait à une longueur d'onde 500 nm.

5. Autopsie

A la fin de l'expérience (40^{ème} jour), 3 animaux de chaque lot sont sacrifiés et une autopsie est réalisée, afin d'évaluer l'état des différents organes : foie, reins, poumons...

6. Etude statistique

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne et l'écart type. La significativité des résultats est vérifiée par le test de l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph Pad Prism, version 5.03). Le seuil de signification choisi est de 5 % à $P < 0,05$.

$P < 0,05$ difference significative

$P < 0,01$ différence hautement significative

$P < 0,001$ différence très hautement significative

III. Résultats

1. Dosage des mycotoxines extraites de l'aliment composé incubé

Le tableau 25 représente les concentrations des mycotoxines extraites à partir de l'aliment composé après 3 mois d'incubation, comparées aux concentrations maximales autorisées en mycotoxines dans l'alimentation animale, par la Commission de l'Union Européenne (2016) Ou par la Directive 2002/32/CE du Parlement Européen pour l'aflatoxine B1.

Les résultats montrent que les concentrations des Fumonisines, des Aflatoxines et de la toxine T2 sont légèrement supérieures aux teneurs maximales tolérées. Les ochratoxines et la DON, montrent respectivement une concentration 7 et 8 fois plus élevée que celle recommandée.

Tableau 25 : Teneur des mycotoxines dans l'aliment composé incubé

Les mycotoxines	Le DON en ppm	Les fumonisines (B1+B2) en ppm	Les ochratoxines en ppm	La toxine T2 en ppm	Les aflatoxines en ppm
Concentration des mycotoxines extraites de l'aliment composé incubé	40,29 ± 2,9	34,95 ± 3,18	0,713 ± 0,05	0,073 ± 0,015	0,025 ± 0,003
Teneurs maximales tolérées en mycotoxines dans l'alimentation animale (UE, 2016) Ou Directive 2002/32/CE du Parlement Européen	5	20	0.1	--	0.02

Ppm : Partie par million ($\mu\text{g.g}^{-1}$ ou mg.kg^{-1})

2. Détermination des paramètres zootechniques

2.1 Poids vif moyen

La figure 28 illustre l'évolution du poids vifs moyen de différents lots en fonction de temps.

Durant les trois premières semaines, on n'a pas noté de différence significative de poids vif moyen entre les différents lots. A la fin de la 4^{ème} semaine, la figure montre que les poids vifs moyens des poulets du lot NP1600[®] sont plus élevés que ceux des poulets du lot témoin positif. A la 5^{ème} semaine d'âge, les résultats montrent que parmi les produits testés séparément, le NP1600[®] s'est avéré le plus efficace en terme de l'amélioration de poids vif des poulets, avec une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin positif et au traitement préventif au Mycofix[®], alors qu'il ne montre pas de différence significative par rapport au témoin négatif.

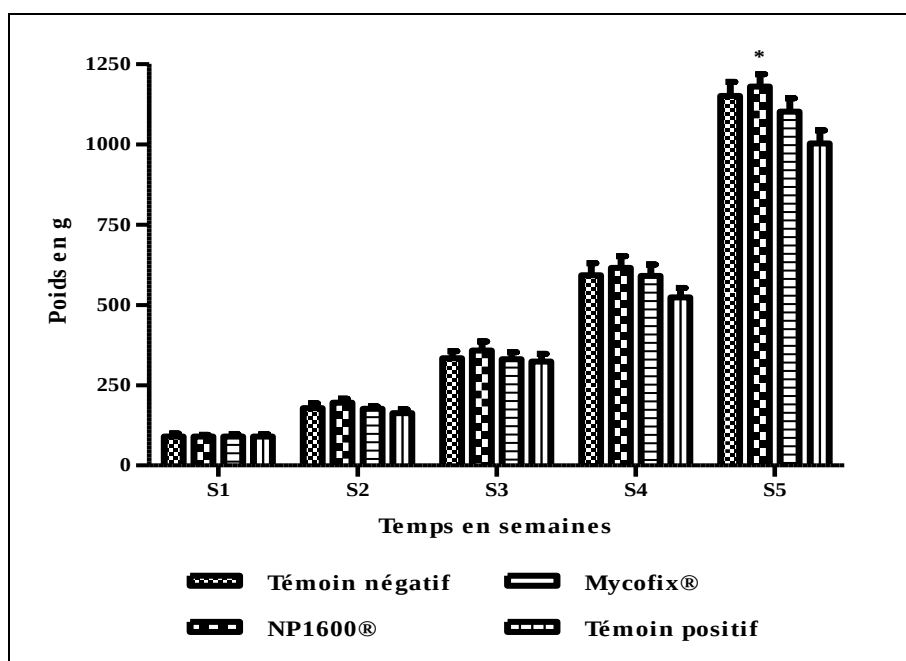


Figure 28 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'évolution du poids vif moyen des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

2.2 Gain du poids vif

Le tableau 26 représente le gain du poids vif moyen des différents lots durant la période d'expérimentation. Le meilleur gain de poids vif est celui des poulets qui ont reçu le NP1600® avec notamment une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin positif. Celui des animaux traités au Mycofix® ne montre pas une différence significative par rapport au témoin positif.

Tableau 26 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le gain de poids moyen des animaux gavés aux mycotoxines

	Poids vif moyen (g)		Gain de poids moyen (g)
	Pi	Pf	
Lot Témoin négatif	37,03±1,23	1150±43,78	1112,97 ±42,55
Lot traité au NP1600® dans l'aliment	37,64±1,47	1179±38,32	1142,25±36,85*
Lot traité au Mycofix®	37,86±1,96	1101,66±41,85	1063,8±39,89
Lot Témoin positif	37,68±1,44	1002,62±40,78	964,94±39,34

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif

Pi : poids initial

Pf : poids final

2.3 Taux de mortalité

Le taux de mortalité est de 6,66 % chez le lot témoin positif. Mais aucune mortalité n'a été enregistré chez le lot d'animaux ayant reçu le NP1600[®] ou le Mycofix[®] durant cette période.

2.4 Consommation alimentaire

Le tableau 27 montre l'évolution de la consommation alimentaire hebdomadaire de différents lots. Le lot d'animaux ayant consommé la plus grande quantité d'aliment durant toute la période d'expérimentation est le témoin positif (2037 g). La quantité d'aliment ingérée par les animaux ayant reçu le NP1600[®] est de 1869,81 g, alors que les animaux traités au Mycofix[®] ont consommé la plus faible quantité d'aliment.

Tableau 27 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la consommation alimentaire hebdomadaire des animaux gavés aux mycotoxines

Lots Semaines	Aliment consommé en g			
	Témoin négatif	NP1600[®]	Mycofix[®]	Témoin positif
S1	90,33	90,33	90,33	90,33
S2	122,72	143,33	133,33	122,72
S3	310	332	299	378,12
S4	586,66	487,5	451,25	645,83
S5	875	816,65	788,33	800
Consommation alimentaire totale en g	1984,71	1869,81	1762,24	2037

2.5 Indice de consommation IC

Les résultats du tableau 28 représentent l'évolution hebdomadaire des indices de consommations de différents lots.

Nous avons constaté une réduction de l'IC chez les poulets des lots traités aux produits (NP1600[®] et le Mycofix[®]) qui ne dépasse pas 1,93. Cependant, une augmentation de l'IC a été constatée pour les poulets des lots témoins positif et négatif par rapport aux deux autres lots.

A la fin de l'expérience l'IC le plus élevé a été obtenu chez les poulets du lot témoin positif (2,11), alors que les poulets des 2 lots NP1600® (1,63) et Mycofix® (1,65) ont des IC meilleurs que celui du lot témoin positif. L'IC des poulets du lot témoin négatif est 1,78.

Tableau 28: Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur l'indice de consommation hebdomadaire des animaux gavés aux mycotoxines

<div>Lots</div> <div>Semaines</div>	Indice de consommation IC			
	Témoin négatif	NP1600®	Mycofix®	Témoin positif
S1	1,7	1,71	1,72	1,72
S2	1,38	1,37	1,55	1,67
S3	2	2	1,93	2,37
S4	2,27	1,89	1,74	3,21
S5	1,56	1,44	1,54	1,67
IC à la fin de l'expérience	1,78	1,63	1,65	2,11

3. Dosage des ochratoxines dans le foie et les reins des poulets

3.1 Dosage des ochratoxines dans les foies

La figure 29 représente l'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans les foies des animaux.

A la fin de la 3^{ème} semaine d'âge, les résultats montrent que la plus forte concentration des ochratoxines dans les foies des poulets a été enregistrée chez le lot témoin positif, le taux des ochratoxines chez le lot d'animaux témoin négatif est significativement inférieur à celui du lot témoin positif.

Notons par ailleurs la présence des ochratoxines dans les foies des animaux du lot témoin négatif n'ayant pas reçu de mycotoxines.

A la 4^{ème} semaine d'âge, on note une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration des ochratoxines chez le lot d'animaux traité au NP1600® et au Mycofix® par rapport à celui du témoin positif.

A la 5^{ème} semaine d'âge, le traitement préventif au NP1600[®] s'est avéré encore plus efficace en terme de diminution de la concentration des ochratoxines dans les foies, avec une différence très hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au témoin positif. Une diminution hautement significative ($p < 0,01$) du taux des ochratoxines a été également constatée chez le lot traité au Mycofix[®].

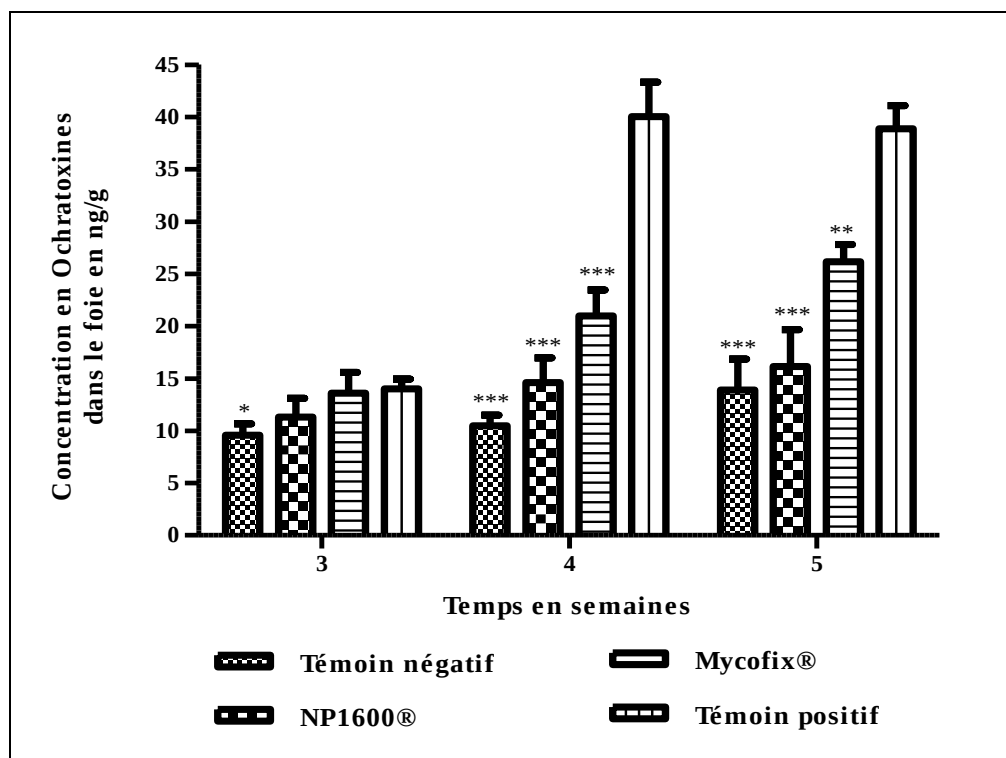


Figure 29 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la concentration des ochratoxines dans les foies des animaux

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

*** : $p < 0,001$

3.2 Dosage des ochratoxines dans les reins

La figure 30 représente la concentration des ochratoxines dans les reins des poulets de différents lots d'animaux.

A la 3^{ème} semaine d'âge, les résultats montrent que la concentration des ochratoxines dans les reins des poulets traités au NP1600[®] est significativement inférieure ($p < 0,001$) à celle du témoin positif. Alors que le Mycofix[®] montre un effet modéré par rapport au témoin positif ($p < 0,01$).

A la 4^{ème} la 5^{ème} semaines d'âge, les lots d'animaux traités au NP1600[®] ou au Mycofix[®] ont montré une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration des ochratoxines par rapport au lot témoin positif.

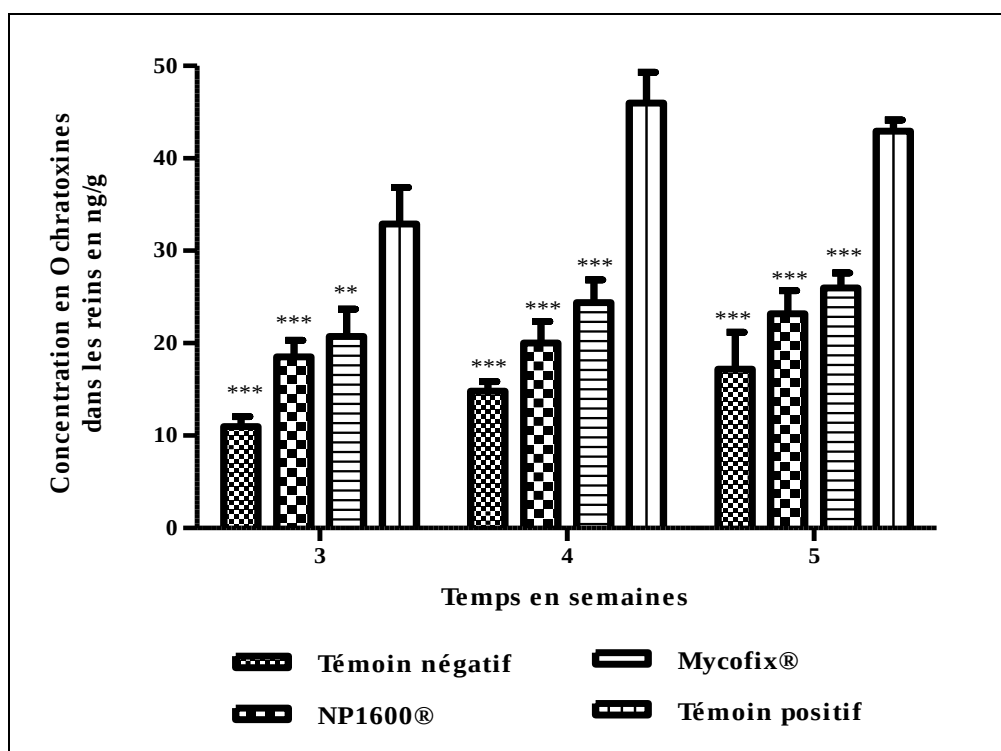


Figure 30 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur concentration des ochratoxines dans les reins des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

*** : $p < 0,001$

4. Etude des caractéristiques des organes (Abats)

4.1 Foie

4.1.1 Poids des foies

La figure 31 illustre les poids des foies des poulets à la fin de la 3^{ème}, la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine d'âge. A la 3^{ème} semaine d'âge, aucune différence significative de poids de foie des animaux de différents lots n'a été enregistrée. Cependant, à la 4^{ème} semaine d'âge, le poids moyen des foies de poulets du lot témoin positif est supérieur à ceux des autres lots (NP1600®, Mycofix®) avec une différence significative ($p < 0,05$). A la 5^{ème} semaine d'âge, une différence significative ($p < 0,05$) a été enregistrée entre le poids des foies du lot témoin positif et celui des animaux des autres lots.

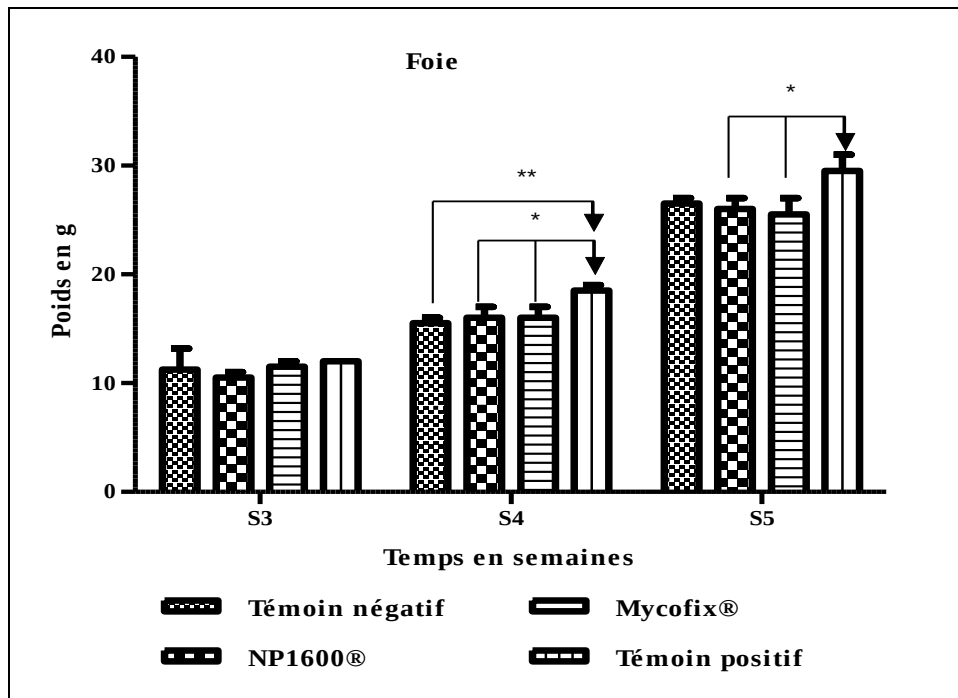


Figure 31 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids des foies des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

4.1.2 Poids relatif des foies

Le tableau 29 représente les résultats du poids relatif du foie. Ce rapport est le plus élevé à la fin des trois semaines S3, S4 et S5 chez le lot témoin positif par rapport aux autres lots.

Tableau 29: Poids relatif du foie

Lots Semaine	Poids relatif du foie (%)			
	Témoin négatif	NP1600®	Mycofix®	Témoin positif
S3	3,37±0,062	2,93±0,128 *	3,48±0,25	3,74±0
S4	2,62±0,24 *	2,62±0,19 *	2,71±0,20 *	3,52±0,057
S5	2,3±0,67	2,21±0,15	2,31±0,25	2,8±0,22

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

4.1.3 Observation macroscopique des foies

L'examen macroscopique des foies des animaux des différents lots, montre que le foie des poulets du lot témoin positif est hypertrophié (figure 33), sa couleur est complètement pâle et tend vers le jaune, alors que le foie de l'animal traité au NP1600® et celui du témoin négatif sont

normaux et dans un excellent état par rapport aux autres lots. Le foie de l'animal qui a reçu le Mycofix® a une couleur normale avec quelques taches rouges (figure 32).

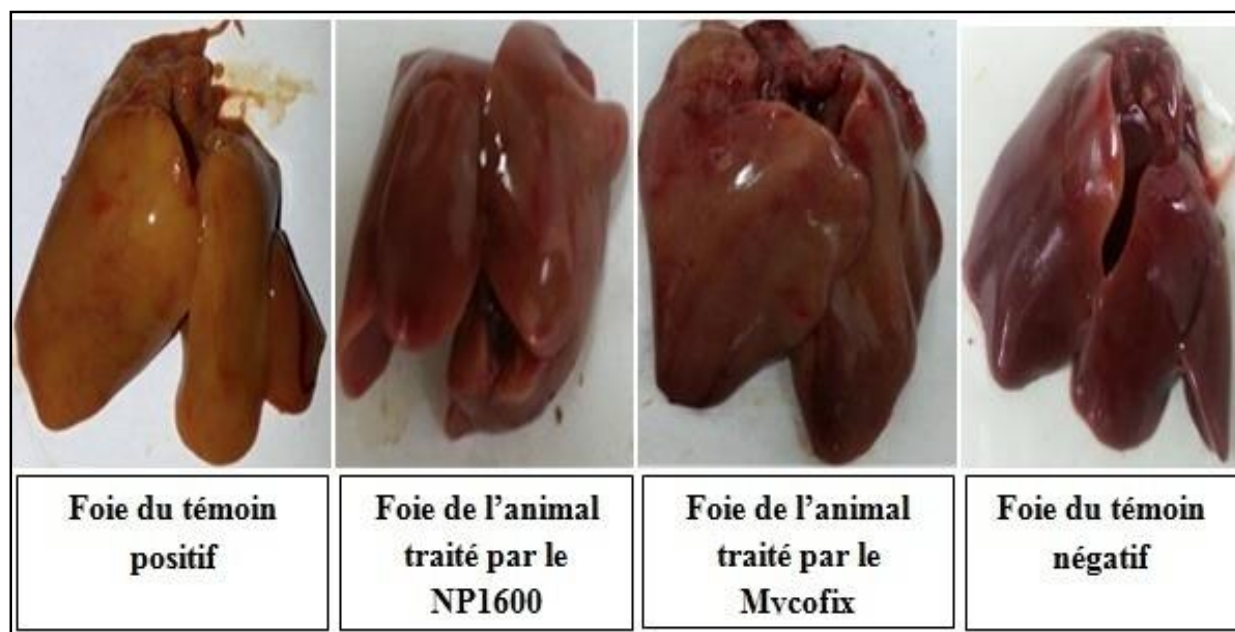


Figure 32: Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les foies des animaux gavés aux mycotoxines



Figure 33 : Comparaison entre le foie de poulet du lot témoin négatif (a) et du lot témoin positif (b)

4.2 Reins

4.2.1 Poids des reins

La figure 34 représente le poids des reins des poulets à la fin de la 3^{ème}, 4^{ème} et la 5^{ème} semaines d'âge.

La figure 34 montre que le poids des reins des poulets du lot témoin positif est le plus élevé. A la 5^{ème} semaine d'âge, une différence significative ($p < 0,05$) de poids des reins a été bien illustrée

entre le lot traité au NP1600® et le témoin positif. Notons également l'absence de différence significative entre les poids des reins des animaux traités au Mycofix® et ceux du lot témoin positif.

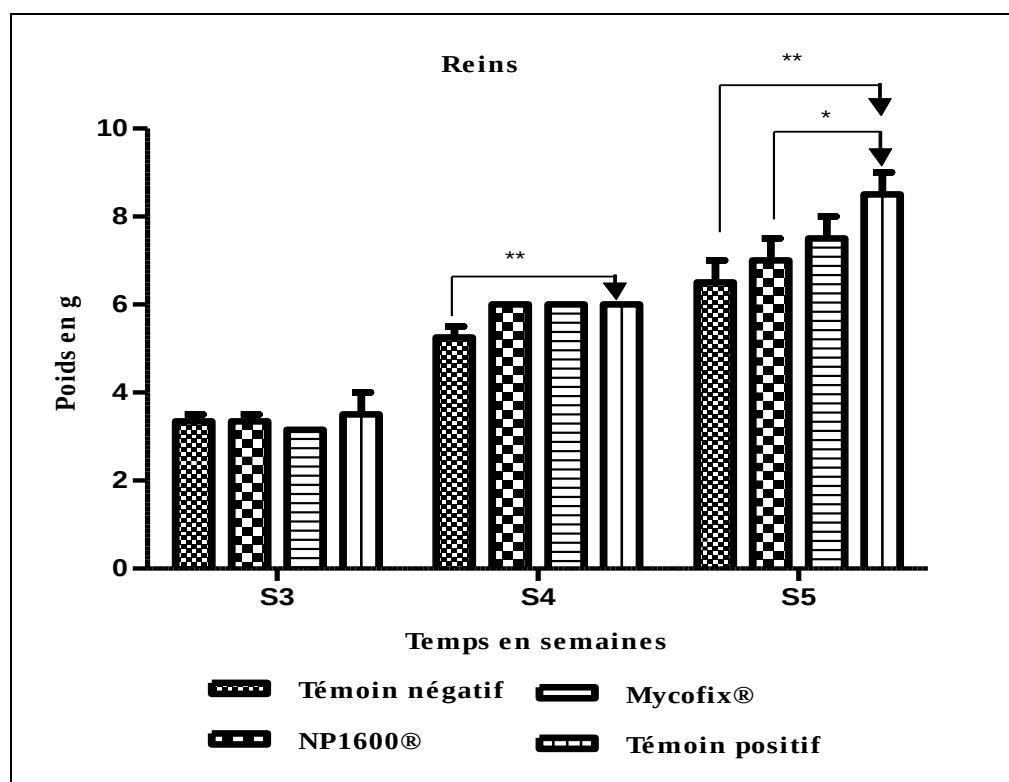


Figure 34 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids des reins des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

4.2.2 Poids relatif des reins

Le tableau 30 représente les résultats du poids relatif des reins. Ce rapport est le plus élevé durant les trois semaines chez le lot d'animaux témoins positifs par rapport aux autres lots.

Tableau 30: Poids relatif des reins

Lots d'animaux Semaines	Poids relatif des reins			
	Témoin négatif	NP1600®	Mycofix®	Témoin positif
S3	1,005±0,04	0,93±0,03	0,95±0	1,09±0,096
S4	0,88±0,22	0,98±0	1,01±0	1,14±0
S5	0,56±0,06	0,59±0,07	0,68±0,08	0,80±0,07

5. Résultats des autopsies

Les résultats de l'autopsie des poulets des différents lots sacrifiés à la fin de l'expérience (40^{ème} jour) montrent que les organes des poulets des lots qui sont traités au NP1600[®] sont normaux. Par ailleurs, les voies aériennes (la trachée, les sacs aériens, les poumons) ainsi que le péricarde des poulets du lot ayant reçu le NP1600[®] étaient dans un excellent état comparés aux autres lots. (Tableau 31).

Tableau 31 : Résultats de l'autopsie des poulets des différents lots à la fin de l'expérience

	Témoin positif	NP1600[®]	Mycofix[®]	Témoin négatif
Jetages nasaux	Absents	Absents	Absents	Absents
Trachée	Légère congestion	Normale	Normale	Normale
Sacs aériens	Opaques	Normaux	+ ou - Opaques	Normaux
Sacs abdominaux	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux
Péricarde	Opaque	Normal	Normal	Normal
Poumons	Normaux	Normaux	Normaux	Normaux
Foie	Friable	Normal	Friable	Normal
Reins	Hypertrophiés	Normaux	Fragiles	Normaux
Bourse de Fabricius	Hypertrophiée	Normale	+ ou - Hypertrophié	Normale
Caeca digestifs	Ballonnement	+/- Gaz	Ballonnement	Ballonnement
Pétéchies	Présence	Absence	Présence	Présence

5.1 L'ascite

Lors des autopsies réalisées à la 3^{ème}, la 4^{ème} et la 5^{ème} semaines d'âge, nous avons constaté la présence d'une ascite (figure 35) chez certains animaux. Elle se traduit par l'accumulation de liquide dans la cavité abdominale.

5.2 Lésions de Colibacillose

L'autopsie a révélé la présence de lésions de colibacillose (figure 36). Chez quelques animaux du lot témoin positif, quelques poulets montrant un foie hypertrophié, recouvert d'un exsudat blanchâtre, gélatineux (périhépatite fibrineuse) ; le péricarde est complètement enrobé d'une couche fibrineuse (péricardite fibrineuse).

5.3 Pétéchies

Nous avons aussi décelé la présence de quelques pétéchies (sont des taches de faible dimension, à la couleur tirant du rouge au violet apparaissant à la surface de certains organes ou sur la paroi interne de certaines cavités) au niveau de la cuisse, qui sont caractéristique de la maladie virale Gumboro (figure 37), chez quelques animaux dans les différents lots expérimentaux sauf ceux du lot traité au NP1600.

5.4 Autres signes

Nous avons aussi décelé la présence d'un ballonnement généralisé au niveau des intestins (figure 38 a) dans tous les lots d'animaux sauf celui des animaux traités au NP1600®.

Aussi, nous avons remarqué l'hypertrophie des reins des animaux des lots gavés aux mycotoxines sauf ceux du lot d'animaux traité au NP1600®.

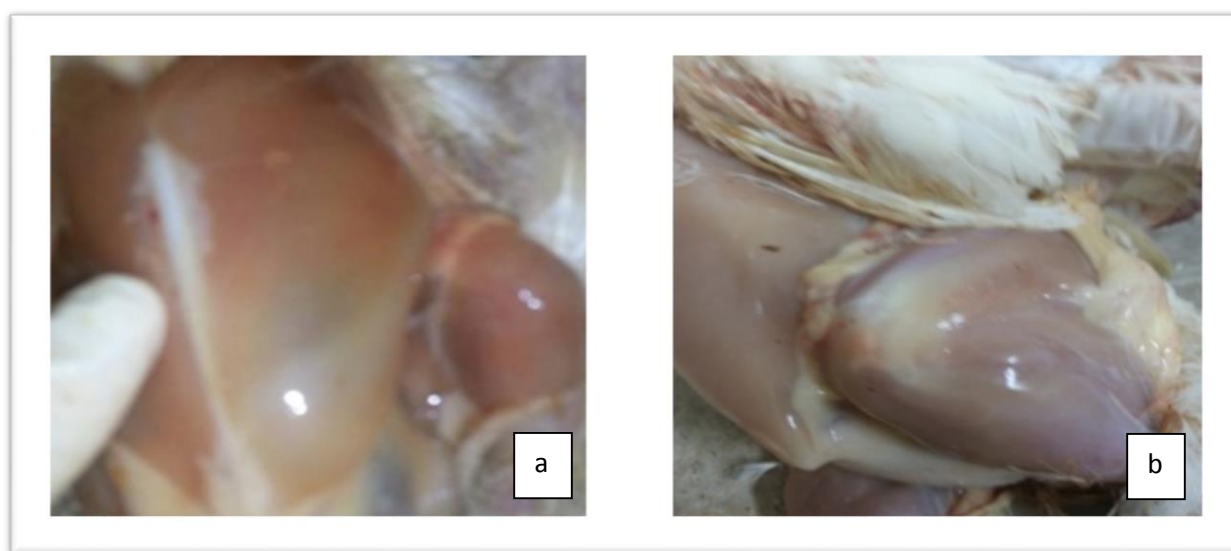


Figure 35 : Ascite d'un poulet (a : Présence d'ascite dans la cavité abdominale, b : Absence d'ascite)

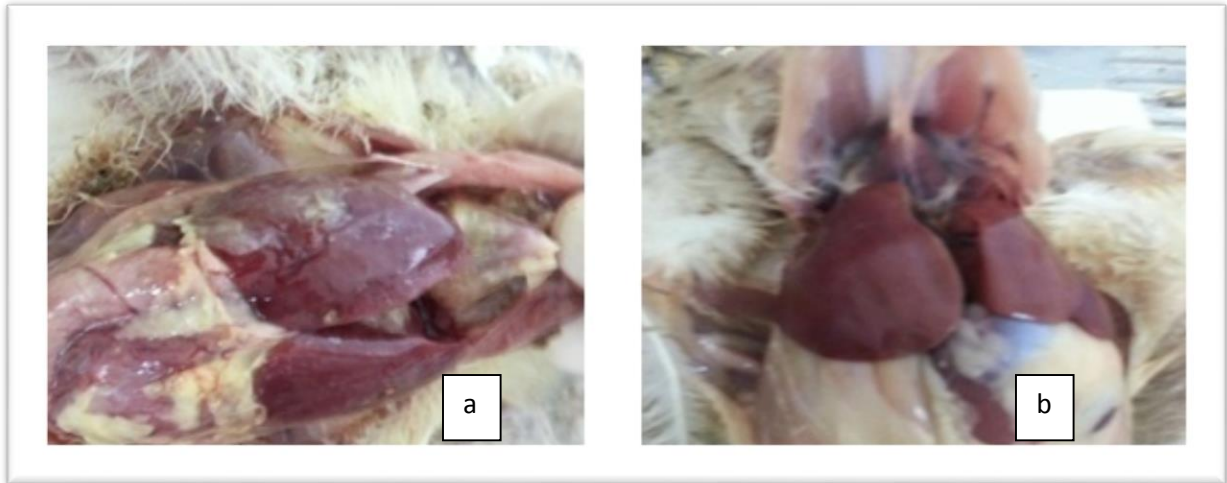


Figure 36 : *Lésions de Colibacillose chez un poulet (a : Présence de la colibacillose, b : Absence de la colibacillose)*



Figure 37 : *Pétéchies chez un poulet (a : Absence de pétéchies, b : Présence de pétéchies)*

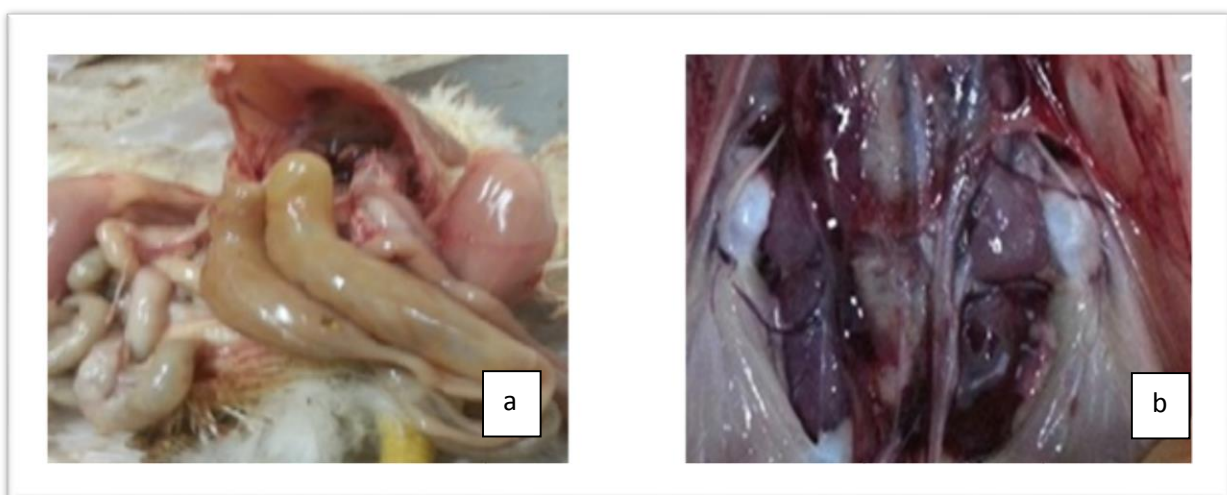


Figure 38 : *a : Ballonnement généralisé des intestins. b : Reins hypertrophiés*

6. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres biochimiques des animaux gavés aux mycotoxines

6.1 Paramètres hépatiques

6.1.1 Protéines totales

Les effets des mycotoxines administrées par voie orale aux poulets pendant 10 jours sur les concentrations sériques en protéines sont présentés sur la figure 39.

A la fin de la 3^{ème} semaine, nous n'avons pas noté de différence significative de la concentration des protéines totales entre les différents lots d'animaux.

A la fin de la 4^{ème} semaine, nous observons des augmentations hautement significatives ($p < 0,01$) de la concentration des protéines totales chez les deux lots d'animaux traités au NP1600® et au Mycofix® par rapport au témoin positif.

A la fin de la 5^{ème} semaine, seule la concentration des protéines totales des animaux traités au NP1600® n'est pas affectée et reste similaire à celle des animaux du lot témoin négatif, et elle est significativement ($p < 0,05$) supérieure à celle du témoin positif.

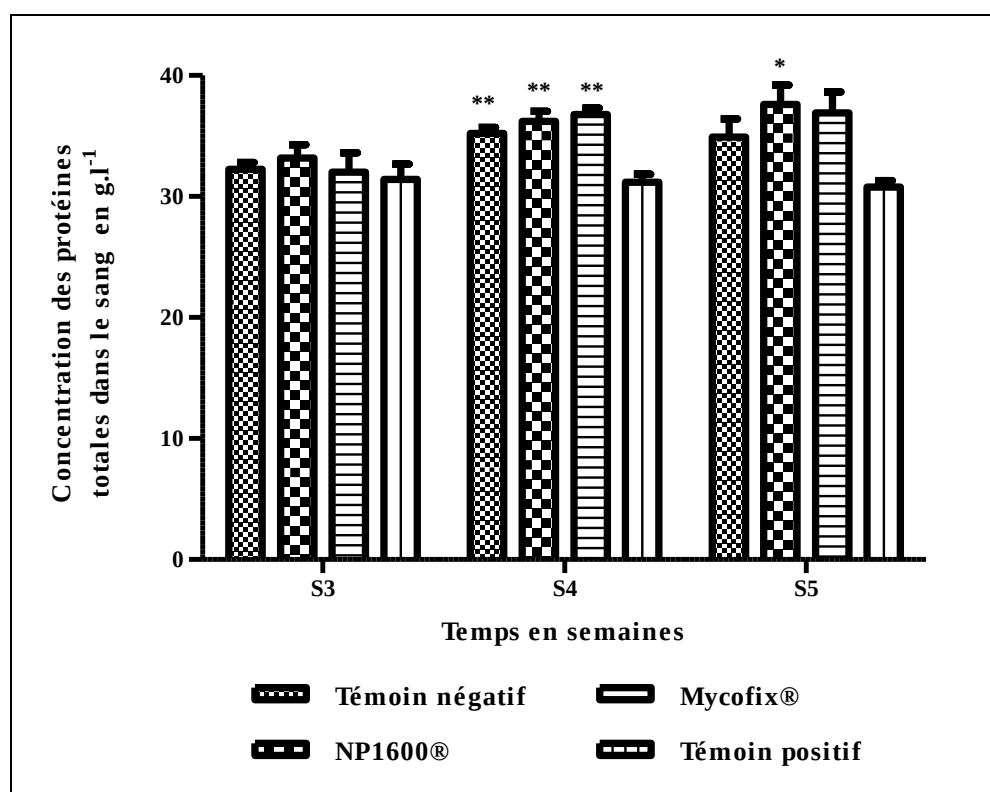


Figure 39 : Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des **protéines totales** des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

6.1.2 ASAT (Aspartate aminotransférase)

La figure 40 représente les valeurs moyennes obtenues suite au dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) dans les différents lots en fonction du temps.

A la fin de la 3^{ème}, de la 4^{ème} et de la 5^{ème} semaine, nous notons une diminution significative ($p < 0,05$) de la quantité de l'ASAT des animaux traités au NP1600[®] par rapport au lot témoin positif et reste similaire à celle des animaux du lot témoin négatif. Cependant, aucune différence significative de la concentration de l'ASAT n'a été constatée chez le lot d'animaux traité au Mycofix[®].

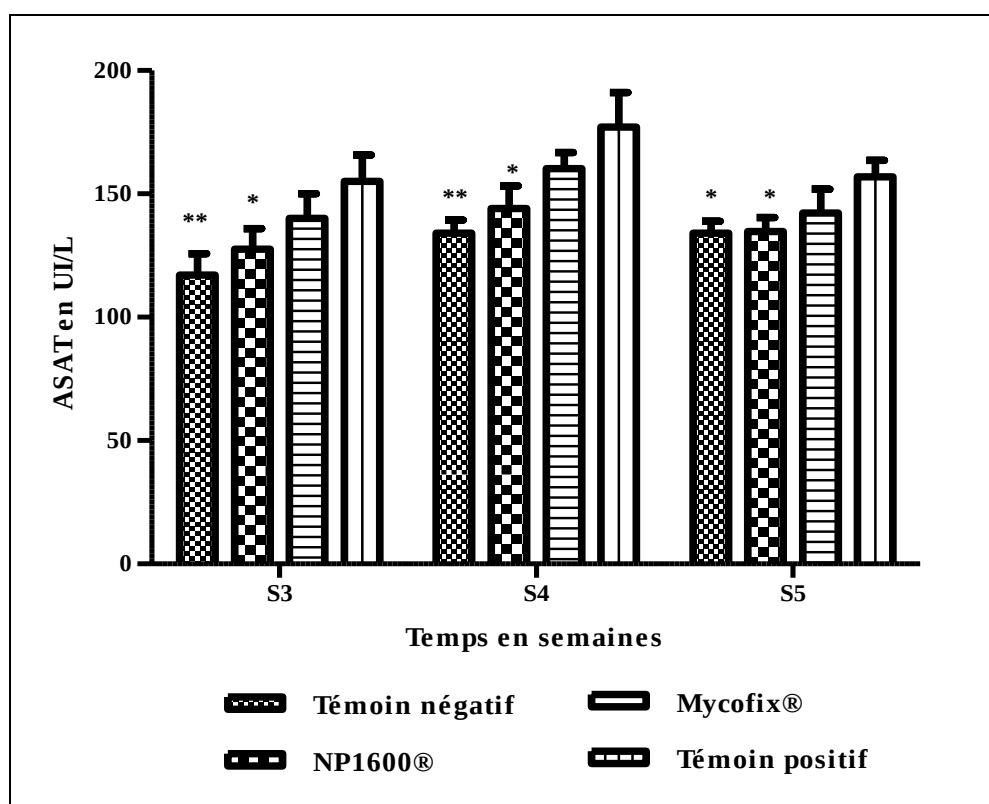


Figure 40 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur l'Aspartate aminotransférase des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

6.1.3 ALAT (Alanine aminotransférase)

La figure 41 représente les valeurs moyennes obtenues pour les différents lots suite au dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT) en fonction du temps.

A la fin de la 3^{ème} semaine d'âge, nous constatons une diminution hautement significative ($p<0,01$) de la quantité de l'ALAT chez le lot d'animaux traité au NP1600[®] par rapport au lot témoin positif. Une diminution moins importante ($p<0,05$) du taux de l'ALAT a été également constatée chez le lot d'animaux traité au Mycofix[®].

A la 4^{ème} semaine d'âge, la quantité de l'ALAT est similaire chez les animaux des deux lots traités au NP1600[®] et au Mycofix[®], avec une différence hautement significative ($p<0,01$) par rapport au témoin positif.

A la 5^{ème} semaine d'âge, le traitement préventif au NP1600[®] s'est avéré encore plus efficace en terme de diminution de la quantité de l'ALAT, avec une différence très hautement significative ($p<0,001$) par rapport au témoin positif, le niveau de l'ALAT n'a pas été affecté et reste proche à celui du lot témoin négatif. On note également une diminution ($p<0,01$) du taux de l'ALAT chez le lot d'animaux traité au Mycofix[®], mais elles moins importante.

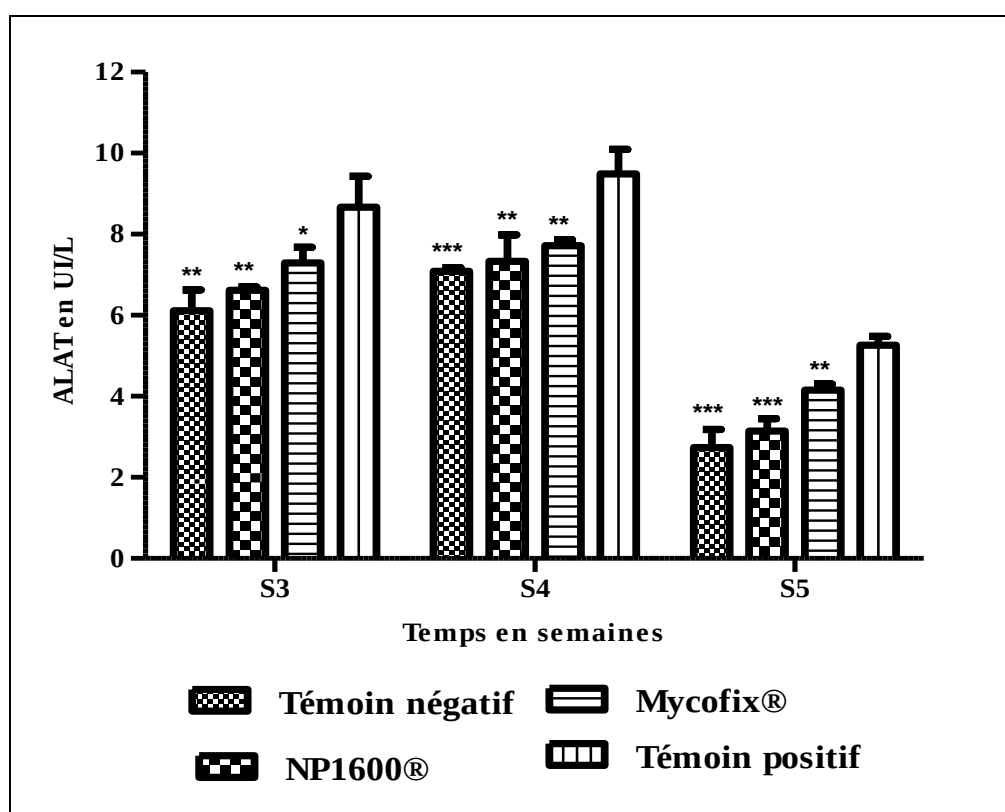


Figure 41 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur l'Alanine aminotransférase des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p<0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p<0,01$

6.2 Paramètres rénaux

6.2.1 L'urée

La figure 42 représente les valeurs moyennes obtenues suite au dosage de la concentration de l'urée en fonction de temps.

A la fin de la 3^{ème} semaine, aucune différence significative de la concentration de l'urée des animaux traités au NP1600[®] et au Mycofix[®] n'a été enregistrée.

A la fin de la 4^{ème} et de la 5^{ème} semaines, nous observons une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration de l'urée des animaux traités au NP1600[®]. Aucune différence significative de la concentration de l'urée n'a été constatée chez le lot d'animaux traité au Mycofix[®].

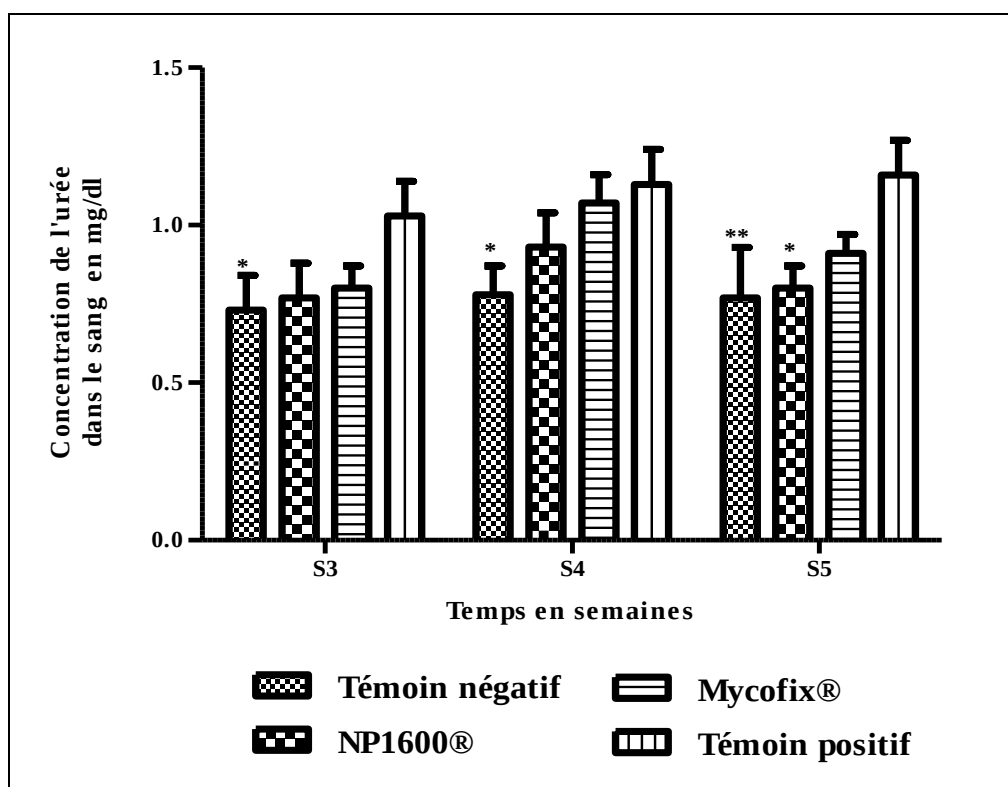


Figure 42 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la concentration de l'urée des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

6.2.2 L'acide urique

La figure 43 montre les valeurs moyennes obtenues suite au dosage de la concentration de l'acide urique dans les différents lots en fonction du temps.

A la fin de la 3^{ème} semaine d'âge, la figure 43 montre une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) de la concentration de l'acide urique chez les animaux traités au NP1600[®] par rapport au témoin positif. Nous observons aussi une diminution hautement significative ($p < 0,01$) de l'acide urique chez les animaux traités au Mycofix[®].

A la 4^{ème} semaine d'âge, le traitement préventif au NP1600[®] fait baisser la concentration de l'acide urique, avec une différence hautement significative ($p < 0,01$) par rapport au témoin positif. Les animaux traités au Mycofix[®] ne montrent pas de modifications significatives par rapport au témoin positif.

A la 5^{ème} semaine d'âge, une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration de l'acide urique chez le lot d'animaux traité au NP1600[®] et celui traité au Mycofix[®], par rapport au lot témoin positif.

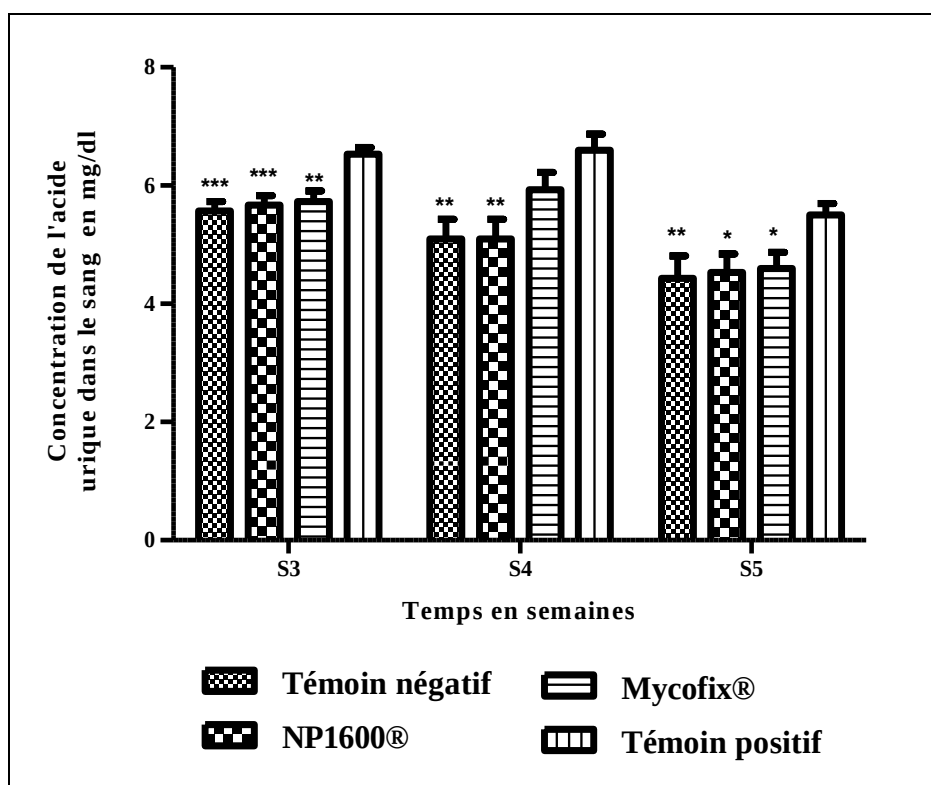


Figure 43 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la concentration de l'acide urique des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

*** : $p < 0,001$

6.2.3 La Créatinine

La figure 44 illustre l'évolution de la concentration de la créatinine des animaux des différents lots tout au long de l'expérience.

A la fin de la 3^{ème} semaine, nous observons une diminution très hautement significative ($p<0,001$) de la concentration de la créatinine des animaux des lots traités au NP1600[®] et au Mycofix[®] par rapport au témoin positif.

A la fin de la 4^{ème} semaine, la concentration de la créatinine des poulets du lot ayant reçu le NP1600[®] continue de baisser d'une manière très hautement significative ($p<0,001$) par rapport au témoin positif, alors que le traitement préventif au Mycofix[®] ne montre pas une différence significative par rapport au témoin positif.

A la fin de la 5^{ème} semaine d'âge, le NP1600[®] s'est avéré le plus efficace en terme de diminution de la concentration de la créatinine, avec une différence hautement significative ($p<0,01$) par rapport au témoin positif. Notons également une diminution significative ($p<0,05$) de la créatinine chez les animaux traités au Mycofix[®].

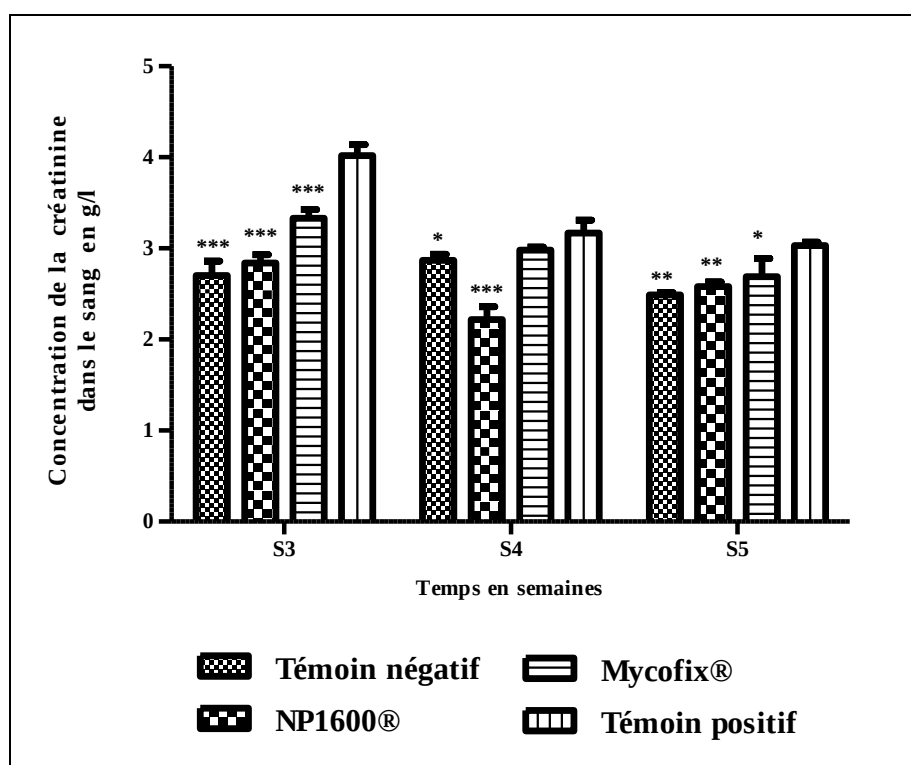


Figure 44 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la concentration de la **créatinine** des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p<0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p<0,01$

*** : $p<0,001$

6.3 Paramètres lipidiques

6.3.1 Le cholestérol

Les effets des mycotoxines administrées par voie orale aux poulets pendant 10 jours sur la concentration du cholestérol sont présentés dans la figure 45.

A la fin de la 3^{ème} semaine, la concentration du cholestérol des poulets du lot ayant reçu le NP1600[®] est plus élevée que celle des poulets des autres lots avec une différence très hautement significative par rapport au témoin positif ($p < 0,001$). On note une différence hautement significative ($p < 0,01$) chez le lot d'animaux traité au Mycofix[®] par rapport au témoin positif.

A la 4^{ème} semaine d'âge, nous observons que seuls les animaux du lot traités au NP1600[®] présentent une différence hautement significative.

A la 5^{ème} semaine d'âge, le traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] montre la même supériorité avec une différence hautement significative par rapport au témoin positif.

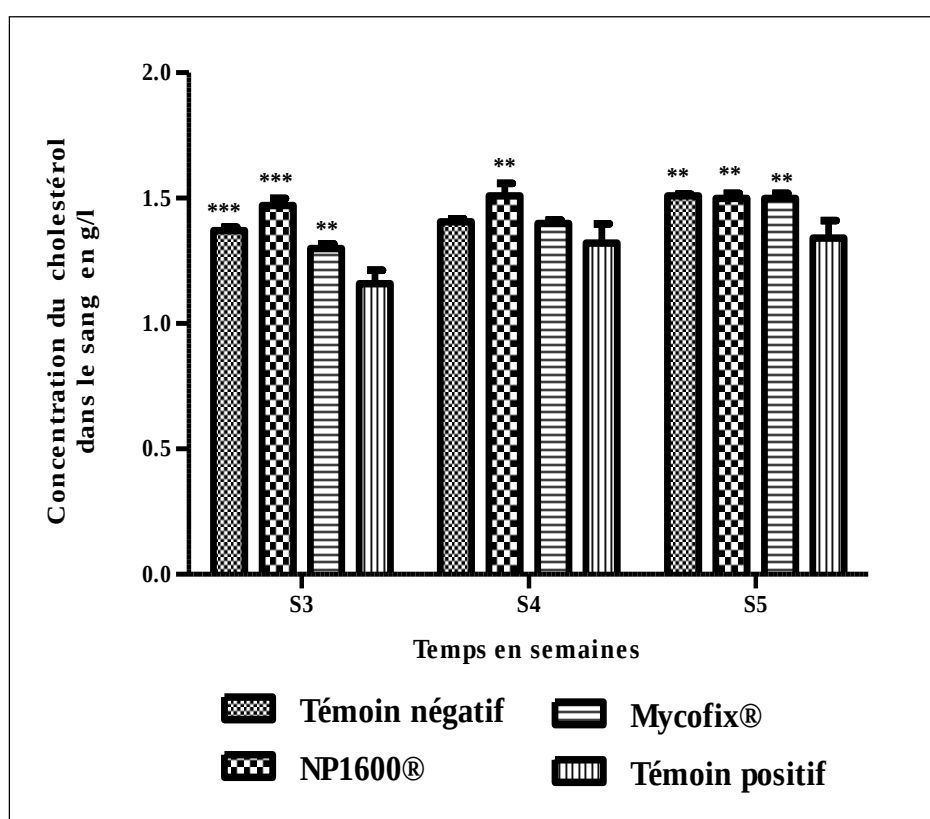


Figure 45 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la concentration du **cholestérol** des animaux gavés aux mycotoxines

** : $p < 0,01$ comparées au témoin positif.

*** : $p < 0,001$

6.3.2 Les triglycérides

La figure 46 représente les valeurs moyennes obtenues suite au dosage de la concentration du triglycéride des animaux gavés par les mycotoxines, en fonction du temps.

A la fin de la 3^{ème}, de la 4^{ème} et de la 5^{ème} semaine, nous observons une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration des triglycérides des animaux traités au NP1600[®] comparés au lot des témoins positifs. Aucune différence significative de la concentration des triglycérides n'a été constatée chez le lot d'animaux traité au Mycofix[®] par rapport au témoin positif.

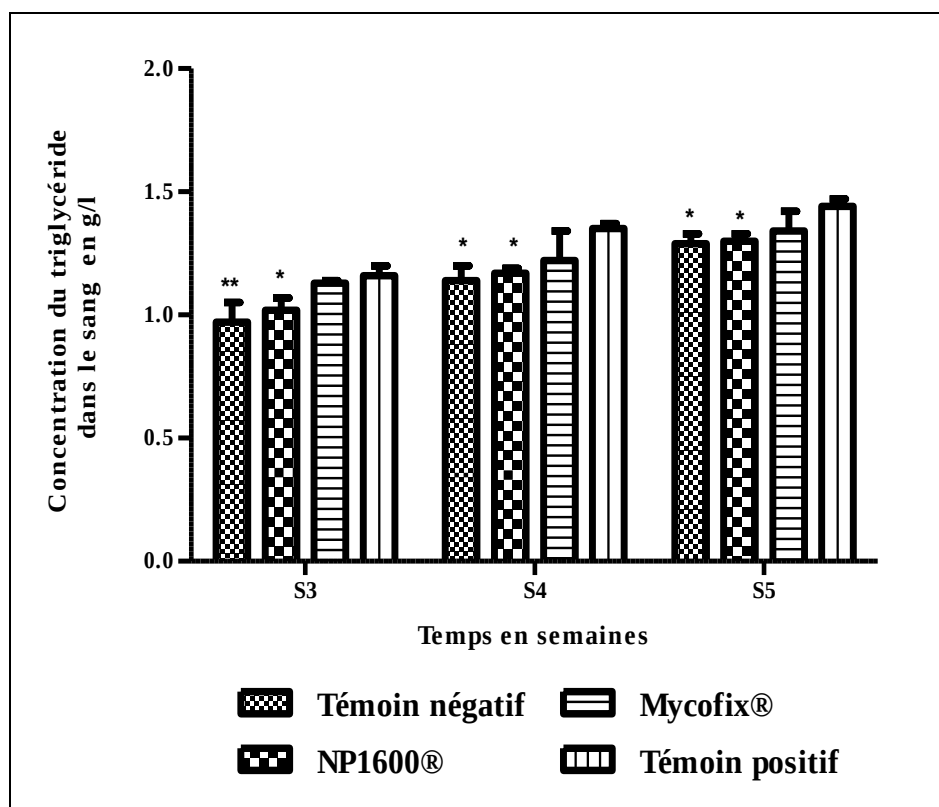


Figure 46 : Effet du traitement préventif au NP1600[®] ou au Mycofix[®] sur la concentration des **triglycérides** des animaux gavés aux mycotoxines

* : $p < 0,05$ comparées au témoin positif.

** : $p < 0,01$

IV. Discussion

Afin de comparer les actions respectives, du Mycofix[®] et du NP1600[®] *in vivo*, nous avons décidé de faire un test dans lequel des animaux reçoivent des mycotoxines par gavage, tout en recevant un aliment traité au NP1600[®] ou au Mycofix[®] et de les comparer avec un lot d'animaux témoin recevant un aliment non traité et ne recevant pas de mycotoxines par gavage et avec un autre lot d'animaux témoins recevant un aliment non traité et étant gavés par les mycotoxines.

Habituellement, dans ce genre d'études, les chercheurs utilisent des mycotoxines purifiées vendues par des sociétés de produits chimiques (Biro et *al.*, 2002). Dans ce cas, la situation expérimentale n'est pas semblable aux conditions normales d'élevage dans lesquelles l'aliment contient plusieurs mycotoxines avec des teneurs variées.

Il est bien connu que la mycotoxicose est souvent le fruit d'une synergie entre ces mycotoxines (Chapeland-Leclerc, 2005), ce qui veut dire que même si dans un aliment chaque mycotoxine à part ne dépasse pas le seuil maximal recommandé, la présence de plusieurs mycotoxines à la fois est capable de provoquer des dégâts liés à l'action toxique conjointe des différentes mycotoxines qui agissent en synergie (Sarandan, 2012).

L'effet de chaque mycotoxine prise individuellement est largement étudié (Biro et *al.*, (2002) ; Khatoon et *al.*, (2016)). Cependant, l'effet de la multi-contamination n'est pas encore connu. Ces dernières années, certains auteurs ont étudié l'effet combiné de certaines mycotoxines (Speijers et *al.*, 2004), notamment l'effet combiné de l'AFB et de l'OTA (Verma et *al.*, 2002 et 2007 ; Sandhu et *al.*, 1995 ; El Golli-Bennour et *al.*, 2010 ; Imperato et *al.*, 2011) et de l'AFB et de la FB (Ogido et *al.*, 2004 ; Bernabucci et *al.*, 2011 ; McKean et *al.*, 2006). La multi-contamination des denrées par les mycotoxines est fréquente ; c'est une multi-production de différentes mycotoxines par une même espèce ou une production simultanée de différentes mycotoxines par plusieurs espèces de moisissures. Il est donc fréquent de trouver plusieurs mycotoxines dans un même aliment, en particulier dans les céréales, vecteurs très importants de mycotoxines. Ces mycotoxines étant peu métabolisées par les organismes vivants, elles peuvent également se retrouver dans les produits d'origine animale tels que la viande et les œufs.

Pour cette raison, nous avons opté pour une méthode qui consiste à laisser moisir spontanément l'aliment composé dans des conditions d'humidité et de température optimales et favorables au développement des moisissures et à la synthèse de mycotoxines. Ensuite nous avons extrait de cet aliment composé les mycotoxines qui sont produites et nous avons utilisé ces mycotoxines afin de mimer une mycotoxicose naturelle.

En effet, le dosage de l'aliment moisi a montré la présence d'au moins cinq types de mycotoxines que nous avons pu doser. L'existence d'autres mycotoxines est probable. Les résultats du dosage montrent que parmi les mycotoxines extraites de l'aliment, les ochratoxines sont les plus représentées avec une concentration de 713 ppb, alors que la teneur maximale recommandée de cette mycotoxine est de 100 ppb. Les autres mycotoxines qui sont les aflatoxines, la DON, les fumonisines et la toxine T2 sont aussi présentes à des doses supérieures aux doses maximales tolérées dans l'aliment de volaille par la Directive 2002/32/CE du Parlement Européen et par la Commission de l'Union Européenne (2016). Ainsi, nous avons obtenu un mélange de mycotoxines qu'il aurait été très difficile de réaliser en achetant des mycotoxines purifiées. Ce mélange de mycotoxines est ensuite extrait par solvant pour être utilisé dans notre expérience afin de provoquer une mycotoxicose.

1. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres zootechniques des animaux gavés aux mycotoxines

Afin de s'assurer que chaque poussin a bien reçu la même quantité de mycotoxines durant l'expérience, nous avons décidé de les administrer par gavage au lieu de les mélanger avec l'aliment. Dans la majorité des études qui visent à reproduire les mycotoxicoses, les mycotoxines sont mélangées avec l'aliment (Sarandan, 2012 ; Denli, 2006). Dans ces conditions, les animaux du même lot ne reçoivent pas forcément la même quantité de mycotoxines. Des poussins de 7 jours ont reçu un aliment qui contient soit le NP1600® (2 g.kg⁻¹ d'aliment) soit le Mycofix® (2 g.kg⁻¹ d'aliment) pendant toute la durée de l'expérience. Ensuite, à partir du jour J10, les poussins ont été gavés un jour sur deux pendant 20 jours par un mélange de mycotoxines. Les résultats obtenus au niveau du poids des animaux ne montrent de différences significatives qu'au bout de 5 semaines d'âge. Le lot de poussins recevant les mycotoxines avec un aliment non traité (témoin positif) présente un retard de croissance évident. Le lot d'animaux ne recevant ni mycotoxines ni aliment traité (témoin négatif) présente un poids supérieur à celui du témoin positif.

Cette différence de poids pourrait s'expliquer par le fait que les mycotoxines seraient à l'origine du retard de croissance observé. Ce retard fait partie des symptômes connus de la mycotoxicose selon Patil (2014). Les études de Pohland et *al.*, (1992) ; Pfohl-Leskowicz et Castegnaro (1999) ; Pfohl-Leskowicz et *al.*, (2002) ont montré l'effet délétère des mycotoxines sur différents organes tels que les intestins, ce qui peut conduire à une mauvaise absorption des nutriments au niveau de l'épithélium intestinal et par conséquent une diminution du poids corporel

L'effet du NP1600® et du Mycofix® montre une efficacité qui se traduit par une meilleure prise de poids des animaux. Cependant, le lot d'animaux traité au NP1600® montre un poids supérieur à celui du lot d'animaux traité au Mycofix® et même à celui des animaux du lot témoin négatif (ayant été gavés à l'eau seulement et reçu un aliment dépourvu de Mycofix® ou de NP1600®). Statistiquement, le lot NP1600® présente un poids significativement supérieur à celui du lot témoin positif. Nous pouvons donc dire que le NP1600® permet une protection contre la mycotoxicose. La supériorité d'action des deux lots d'animaux traités au NP1600® ou au Mycofix® par rapport au lot d'animaux recevant les mycotoxines et non traités (témoin positif) se répercute sur le gain de poids vif et sur l'indice de consommation.

2. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur le poids relatif des foies et des reins des animaux gavés aux mycotoxines

Les différences constatées au niveau des performances zootechniques ont été confirmées par l'état des organes. Le foie et les reins de trois animaux de chaque lot sont sacrifiés, pesés et photographiés afin de comparer leur état à l'œil nu à celui du témoin positif.

Les résultats obtenus montrent qu'à la semaine S3, ce rapport est de 3,74 pour le témoin positif alors qu'il n'est que de 3,37 pour le témoin négatif. Cette différence montre que les mycotoxines provoquent l'hypertrophie hépatique chez le lot témoin positif comparé au lot témoin négatif. Ces résultats confirment ceux obtenus par les travaux de Denli et Okan (2006) qui ont montré que les mycotoxines provoquent l'hypertrophie hépatique et rénale. Cette hypertrophie hépatique est évaluée par le rapport : poids du foie/poids de l'animal X100.

En revanche, les lots d'animaux traités au NP1600® ou au Mycofix®, ce rapport est de 2,93 et 3,48, respectivement, à la semaine S3. Sur le plan statistique, seul le lot NP1600® possède un rapport significativement plus faible que celui du témoin positif. Ce rapport donne des valeurs du même ordre pour les semaines S4 et S5.

La même constatation a été faite avec le poids relatif des reins mais sans que ces différences soient statistiquement significatives. Ces résultats montrent que nos conditions expérimentales ont permis de provoquer des signes caractéristiques de la mycotoxicose à l'échelle des organes cibles que sont le foie et les reins, qui présentent une hypertrophie. Ce rapport est plus faible pour le lot d'animaux traités au NP1600® que celui du lot témoin positif. Les résultats obtenus au niveau des performances zootechniques confirment ceux relatifs à cette hypertrophie.

Le lot traité au NP1600® a montré parfois un poids relatif plus faible même que celui du lot témoin négatif. Ceci va dans le sens d'un effet hépatoprotecteur du NP1600® qui serait meilleur que celui du Mycofix®.

3. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration des ochratoxines dans les foies et les reins des animaux

Cette supériorité d'action du NP1600® par rapport au Mycofix® se confirme lorsque nous avons effectué un dosage des ochratoxines au niveau du foie et des reins. Nous avons présenté les résultats du dosage des ochratoxines (A et B) car c'était les seules mycotoxines qui étaient détectables au niveau du foie et des reins. Les autres mycotoxines étaient pratiquement indétectables par notre système de dosage (résultats non montrés).

L'effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur la concentration en ochratoxines au niveau des reins montrent que ces derniers sont capables de diminuer la quantité des ochratoxines par rapport au témoin positif.

Au niveau du foie, la concentration en ochratoxines est significativement plus importante chez le lot d'animaux des témoins positifs que chez les lots d'animaux traités au NP1600® et au Mycofix®. Par ailleurs une différence statistiquement significative a été constatée entre le lot Mycofix® et le lot NP1600® en faveur d'une supériorité d'action du NP1600®. Ce dernier pourrait jouer le rôle d'un hépatoprotecteur.

L'accumulation des mycotoxines dans le tissu hépatique provoque des signes visibles à l'œil nu (Santin, 2002). Parmi ces signes il y a la couleur et la texture du tissu qui est ferme quand le foie est en bon état et friable quand le foie est fragilisé par les mycotoxines. Une évaluation de la couleur des foies des animaux du lot témoin positif montre que ces derniers présentent un pourcentage non négligeable de décoloration accompagnée de friabilité. Les lots d'animaux traités au Mycofix® ou au NP1600® présentaient des foies de couleur presque normale comparables aux foies du lot témoin négatif.

Ces résultats montrent encore une fois que le NP1600® ainsi que le Mycofix® possèdent une efficacité comparable en tant qu'agents protecteurs contre la mycotoxicose avec une supériorité d'action du NP1600®.

4. Autopsies

L'effet protecteur du NP1600® ne se limite pas au foie et aux reins, mais il apparaît également au niveau de tous les organes au moment de l'autopsie pratiquée sur des animaux sacrifiés à la fin de l'expérience. Les autopsies montrent que les animaux du lot témoin positif présentent des lésions multiples au niveau de la trachée artère, des sacs aériens, du péricarde et de la bourse de Fabricius. On note cependant que les animaux du lot traité au NP1600® et du lot témoin négatif ne présentent pratiquement aucune des lésions observées chez le témoin positif. D'autre part, le lot traité au Mycofix® présente quelques lésions, mais moindres que celles observées chez le lot

témoin positif. L'ascite peut résulter de maladies cardiaques ou hépatiques conséquentes à l'ingestion de substances toxiques (Tremblay et Bernier, 1992). De nombreux facteurs nutritionnels ont été retenus comme responsables étiologiques ; graisses toxiques, aflatoxines (Mureau, 1988 ; Cox, 2005). Une ascite et une péricardite qui sont les signes révélateurs d'une colibacillose ou de la maladie de Gumboro ont été observées chez le lot témoin positif. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Koynarski *et al.* (2007) et de Stoev *et al.* (2002b). Selon ces auteurs les poulets exposés à l'OTA, sont plus sensibles aux infections bactériennes et virales, car l'OTA fait baisser l'immunité (Dwivedi et Burns, 1984 ; Stoev *et al.*, 2000).

Les lésions de maladies bactériennes et virales opportunistes n'ont pas été enregistrées avec le lot NP1600® alors qu'elles étaient présentes chez quelques animaux du lot Mycofix® et même celui du lot témoin négatif.

Tous ces résultats vont dans le sens d'une action protectrice du NP1600® contre la mycotoxicose. Cette action protectrice est au moins aussi bonne que celle du Mycofix® avec une supériorité remarquable au niveau de plusieurs paramètres.

5. Effet du traitement préventif au NP1600® ou au Mycofix® sur les paramètres biochimiques des animaux gavés aux mycotoxines

5.1 Paramètres hépatiques

La concentration sérique en protéines totales chez le lot gavé par les mycotoxines (témoin positif) est inférieure à la normale après la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine. La figure 39 montre une diminution significative de la quantité de protéines totales chez les animaux du lot témoin positif par rapport au témoin négatif. Les animaux traités au NP1600 ou au Mycofix ne montrent pas de modifications significatives par rapport au témoin négatif. La diminution de la quantité de protéines totales chez le lot témoin positif correspond probablement à une cytotoxicité déjà observée par d'autres auteurs qui décrivent une inhibition de la synthèse des macromolécules cellulaires y compris les protéines par les mycotoxines (Creppy, 1986 ; Hong, 2000).

Les transaminases sont des marqueurs biologiques d'une atteinte hépatique et de la nécrose hépatocytaire. La localisation de ces enzymes est surtout hépatique (ils reflètent les fonctions de dégradation du foie), mais aussi musculaire (notamment le muscle cardiaque qui est le plus riche en ASAT).

Nos résultats montrent une augmentation significative des concentrations moyennes (hypertransaminasémie) des ALAT et ASAT chez les animaux gavés par les mycotoxines (témoin positif) par rapport aux animaux du lot témoin négatif. En effet, le pourcentage de

l'augmentation est de l'ordre de 32 % pour l'ASAT et de 48% pour l'ALAT chez les animaux du lot témoin positif en comparaison avec les animaux du lot témoin négatif. Cette augmentation des transaminases pourrait s'expliquer par une cytolyse hépatique comme il a été préconisé par Reynier (2011). Le taux de réduction de l'ASAT (par rapport aux animaux du lot témoin positif) chez les animaux traités au Mycofix ou au NP1600, est de 7% et 16%, respectivement. Tandis que le taux de l'ALAT des animaux traités au Mycofix ou au NP1600 est de 7,5% et 15%. Ces taux sont inférieurs à ceux des ASAT et ALAT des animaux du lot témoin positif et proches de ceux des animaux du lot témoin négatif.

L'effet hépato-protecteur des deux produits, NP1600 et le Mycofix pourrait s'expliquer par leur richesse en adsorbants de mycotoxines qui empêchent ces dernières de traverser la barrière intestinale (Boudra, 2009 ; Dakovic et *al.*, 2005).

5.2 Paramètres rénaux

L'investigation du bilan rénal permet de juger de la toxicité des mycotoxines. Nous remarquons une augmentation de la concentration de l'urée chez les animaux du lot témoin positif. Ces résultats sont en accord avec ceux de Rouvier, (2002) ; de Abdelwahab et *al.*, (2005) et de Canadas, (2006). Ces auteurs ont rapporté que l'ajout des aflatoxines et des ochratoxines dans l'aliment entraînaient une augmentation du taux de l'urée. Ces mêmes auteurs indiquent que ces molécules sont dotées d'inducteurs de stress hépatique et rénal. Selon Firmin (2011), l'augmentation de la concentration de l'urée est probablement due à une atteinte rénale ou à la réabsorption des protéines du sang après la digestion, sous forme d'acides aminés dans les parties proximales de l'intestin ce qui fait augmenter le taux de l'urée plasmatique. La concentration de l'urée sanguine est dépendante non seulement de la filtration glomérulaire mais aussi de l'apport en protéines alimentaires, du catabolisme protéique de l'organisme, de la capacité de production du foie.

Avec le traitement au NP1600® ou au Mycofix®, les concentrations en urée sont presque semblables à celles du lot témoin négatif.

L'acide urique est le produit principal du catabolisme azoté. L'évaluation des concentrations d'acide urique dans le plasma ou le sérum est largement utilisée chez la volaille pour la détection de maladies rénales. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le taux d'acide urique augmente chez le lot témoin positif par rapport au lot d'animaux des témoins négatifs. Cette augmentation en acide urique et en créatinine reflète des dommages rénaux induits par les mycotoxines. Selon Gentles et *al.* (1999) et Joo et *al.* (2013), l'augmentation en acide urique est

due à l'altération de la fonction rénale. A la 5^{ème} semaine d'âge, une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration de l'acide urique chez le lot d'animaux traité au NP1600[®] et celui traité au Mycofix[®], a été constatée par rapport au lot témoin positif. On peut donc supposer que l'ajout du NP1600[®] ou du Mycofix[®] dans l'aliment des animaux gavés par les mycotoxines normalise le taux de l'acide urique.

La créatinine provient de la dégradation de la créatine qui, d'une part, est contenue dans l'alimentation et, d'autre part, est produite par l'organisme. Elle est considérée comme étant un très bon marqueur de la fonction rénale (Berroukech, 2010). Nos résultats montrent une augmentation de la concentration de la créatinine dans le sang chez les poulets gavés par les mycotoxines (témoin positif). Nos résultats sont en accord avec ceux de Steov et *al.* (2002) et Denli et *al.* (2008) qui ont rapporté que l'administration des ochratoxines entraînait une augmentation des taux de la créatinine dans le sang. Selon ces auteurs, cette augmentation serait due à l'altération de la fonction rénale.

Nous avons constaté que le niveau de la concentration de la créatinine chez les poulets traités au NP1600[®] ou au Mycofix[®] puis gavés aux mycotoxines était normale, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet protecteur de ces deux produits.

5.3 Paramètres lipidiques

Les triglycérides sont des graisses neutres qui constituent des réserves énergétiques du foie et participent à diverses voies métaboliques. Nos résultats révèlent une augmentation significative du taux des triglycérides chez les animaux gavés par les mycotoxines par rapport à ceux non gavés. Selon Kalorey et *al.* (2005), cette augmentation pourrait être due à une altération du métabolisme hépatique.

Le traitement prophylactique au NP1600[®] ou au Mycofix[®] semble réduire le taux de triglycérides chez les animaux gavés aux mycotoxines

Quant au taux de cholestérol sérique chez les poulets du lot d'animaux gavés par les mycotoxines, il reste significativement inférieur à celui du lot témoin négatif. Cette diminution du taux de cholestérol total dans le sang des poulets pourrait être un des indicateurs de l'hépatotoxicité des mycotoxines. Selon Stoev et *al.* (2000), l'administration de l'OTA est capable d'induire une légère dégénérescence des hépatocytes qui conduit par conséquent à la diminution de la concentration sanguine du cholestérol. L'ajout de NP1600[®] ou de Mycofix[®] dans l'aliment des animaux gavés ensuite aux mycotoxines contribuerait à la normalisation du taux de cholestérol au bout de la 5^{ème} semaine.

V. Conclusion

Cette dernière partie nous a permis d'évaluer les effets d'un mélange de mycotoxines naturelles sur les performances zootechniques, le poids relatif des organes, les paramètres biochimiques et l'accumulation de résidus de mycotoxines dans le foie et les reins des poulets, ayant reçu un aliment traité au NP1600® ou au Mycofix® afin de comparer leurs actions. Les résultats que nous avons obtenus en traitement prophylactique nous ont permis de conclure que :

- ✓ Le NP1600® et le Mycofix® permettent d'améliorer, en traitement préventif (2 g.kg⁻¹ d'aliment), les paramètres zootechniques qui sont le poids vif moyen, le gain de poids, l'indice de consommation, la consommation alimentaire, avec une supériorité d'action du NP1600®.
- ✓ Les résultats du dosage des paramètres biochimiques montrent que les animaux du lot témoin positif avaient des teneurs en urée, acide urique, ASAT, ALAT, créatinine, triglycérides, cholestérol et protéines totales, en faveur d'une souffrance rénale et hépatique. Chez les lots d'animaux traités au NP1600® ou au Mycofix®, ces paramètres étaient significativement différents et proches de ceux du lot témoin négatif. Ceci signifie que les deux traitements possèdent une efficacité de protection contre les problèmes provoqués par les mycotoxines.
- ✓ Le traitement préventif au Mycofix® ou au NP1600® réduit le taux de l'accumulation de résidus des ochratoxines dans le foie et les reins.

Le NP1600® peut donc être utile pour le traitement préventif contre la mycotoxicose en aviculture.

Conclusion générale

Tout au long de la chaîne alimentaire, des moisissures peuvent se développer et produire des mycotoxines. Ce sont des composés toxiques naturels issus du métabolisme secondaire des moisissures, susceptibles de contaminer l'alimentation animale et humaine, provoquant de nombreuses pathologies (hépatotoxicité, néphrotoxicité, neurotoxicité, mutagénicité, tératogénicité, cancérogénicité...). Devant ce constat, nous nous sommes intéressés à étudier l'efficacité d'un nouvel adsorbant à base des argiles et des huiles essentielles nommé NP1600[®] (un produit mis au point dans notre laboratoire, homologué et autorisé par l'ONSSA) *in vitro* et *in vivo*.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation de l'adsorption des aflatoxines et des ochratoxines par sept adsorbants en utilisant un modèle *in vitro* qui mime le système digestif du porc. Les résultats de l'adsorption des aflatoxines obtenus ont montré que le produit le plus efficace est le NP1600[®] (98,7%) suivi par le Mycofix[®] (93,26%), la bentonite B (91,85%), le calibrin A (88,34%), la stévensite (86,13%), le calibrin Z (83,52%) et enfin la bentonite A (71,85%). Le NP1600[®] donne la meilleure réduction du taux des ochratoxines, il permet d'en absorber 45,69%. Le Mycofix[®] provoque une réduction de 33,08%. Les autres produits testés provoquent une réduction des ochratoxines comprise entre 20 et 27%. Nous avons ensuite comparé l'effet du NP1600[®], du Mycofix[®] et des argiles non activées sur la production des mycotoxines et le développement des moisissures dans les échantillons de maïs après 8 mois de stockage. Les résultats obtenus montrent une supériorité d'action du NP1600[®] à la faible concentration (1 g.kg⁻¹). Puisqu'il a montré une grande efficacité dans la lutte à la fois contre la production des quatre types de mycotoxines dosées et réduit la charge fongique de 4 facteurs log.

Ces résultats obtenus *in vitro* nous ont poussés à appliquer le NP1600[®] dans une expérimentation *in vivo* en traitement prophylactique d'une ochratoxicose que nous avons induit expérimentalement en le comparant au Mycofix[®] chez le poulet de chair. Pour cela nous avons isolé et identifié les moisissures des grains de maïs contaminés naturellement, puis nous avons évalué le pouvoir toxigène de souches isolées et leur capacité à produire les ochratoxines. Les résultats de l'analyse mycologique du maïs ont révélé la dominance des espèces qui appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Les résultats de l'analyse mycotoxicologique montrent qu'*Aspergillus* section des nigri est capable de produire les ochratoxines. Le NP1600[®] ou le Mycofix[®] permet d'améliorer en traitement préventif (2 g.kg⁻¹

d'aliment), les paramètres zootechniques des poulets gavés aux ochratoxines, avec une supériorité d'action du NP1600[®]. Le traitement préventif au Mycofix[®] ou au NP1600[®] réduit le taux de l'accumulation de résidus des ochratoxines dans le foie et les reins. Cette évaluation de l'action protectrice du NP1600[®] ou du Mycofix[®] contre les effets délétères des ochratoxines est considérée comme un test préclinique très prometteur. Pour cela, nous avons jugé nécessaire de tester ces mêmes produits dans le cas d'une multicontamination par les mycotoxines. Cette étude a consisté à évaluer les effets des mycotoxines sur les performances zootechniques, le poids relatif des organes, les paramètres biochimiques et l'accumulation de résidus de mycotoxines dans le foie et les reins des poulets, tout en prenant un aliment traité au NP1600[®] ou au Mycofix[®] afin de comparer leurs actions. Les résultats que nous avons obtenus en traitement prophylactique nous ont permis de conclure que le NP1600[®] et le Mycofix[®] permettent d'améliorer en traitement préventif (2 g.kg⁻¹ d'aliment), les paramètres zootechniques, avec une supériorité d'action du NP1600[®]. Les résultats du dosage des paramètres biochimiques montrent que les animaux du lot témoin positif avaient des teneurs en urée, acide urique, ASAT, ALAT, créatinine, triglycérides, cholestérol et protéines totales, en faveur d'une souffrance rénale et hépatique et d'une inflammation généralisée. Chez les lots d'animaux traités au NP1600[®] ou au Mycofix[®], ces paramètres étaient significativement différents et proches de ceux du lot témoin négatif. Ceci signifie que les deux traitements possèdent une efficacité de protection contre les problèmes provoqués par les mycotoxines. Ainsi, le traitement préventif au Mycofix[®] ou au NP1600[®] réduit le taux de l'accumulation de résidus des ochratoxines dans le foie et les reins.

Enfin, le NP1600[®] peut donc être utilisé durant le stockage des matières premières pour éviter le développement des moisissures et la production des mycotoxines. Ainsi le NP1600 pourrait être introduit dans la fabrication de l'aliment composé pour le traitement préventif des mycotoxicoses en aviculture.

Perspectives envisagées

- ✓ Les résultats de la première partie de ce travail nous ouvrent les perspectives de recherches telles que :
 - Déterminer l'efficacité d'adsorption de NP1600 contre les mycotoxines hydrophobes (ZEA, DON, Toxine T2).
 - Tester également l'efficacité d'un mélange d'adsorbants comme le NP1600 et parois de levure, et voir s'ils sont plus efficaces que l'ajout d'un seul type d'adsorbant.
- ✓ Concernant la deuxième partie de cette étude,
 - Utiliser des mycotoxines marquées qui pourraient également être ingérées dans ce type de modèle pour déterminer la stabilité du complexe NP1600/mycotoxines. Nous pourrions ainsi suivre le trajet des mycotoxines de l'absorption à l'excrétion avec ou sans adsorbant.
 - S'assurer que l'adsorption est spécifique aux mycotoxines et que des nutriments essentiels au bon fonctionnement de l'animal ne soient pas piégés.
 - Déterminer l'efficacité d'adsorption des endotoxines

Références bibliographiques

a

- ✓ **Abbès, S., Ben Salah-Abbès, J., Jebali, R., Younes, R.B., Oueslati, R.** (2016). Interaction of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: Possible protective role using lactic acid bacteria. *J. Immunotoxicol.* **13**, p. 46–54.
- ✓ **Abbes, S., Ouanes, Z., Ben Salah-Abbes, J., Houas, Z., Oueslati, R., Bacha, H. and Othman, O.** (2006). The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice. *Toxicon.* **47**, p. 567-74.
- ✓ **Abdel-Wahhab, M.A., et Aly, S.E.** (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *J. Appl. Toxicol.* **25**, p. 218–223.
- ✓ **Abo-Norag, M., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Harvey, R.B. et Phillips, T.D.** (1995). Influence of a hydrated sodium calcium aluminosilicate and virginiamycin on aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.*, **74**, p. 626-32.
- ✓ **Abrunhosa, L., Morales, H., Soares C., Calado T, VilaChã A.S., Pereira M. and Venâncio A.** (2016). A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **56**, p. 249–265.
- ✓ **AFSSA** L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. (2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final. Fougères : Agence Française de Sécurité Sanitaire Alimentaire.
- ✓ **AFSSA.** (2006). Rapport synthétique de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale, décembre 2006.
- ✓ **Aisawa, S., Takahashi, N., Kikuchi, S., Hirahara, H., and Narita, E.** (2018). Adsorption of aflatoxin b1 on natural clays in aqueous solutions. *Clay Sci.* **22**(2), p. 53-59.
- ✓ **Alborch, L., Bragulat, M. R., Castellá, G., Abarca, M. L and Cabañes, F. J.** (2012). Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain. *Food Microbiol.* **32**, p. 97-103.
- ✓ **Alborch, L., M.R. Bragulat., M.L. Abarca., F.J. Cabañes.** (2011). Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. *Int. J. Food Microbiol.* **147** (1), p. 53-57.
- ✓ **Aman, W.B.** (1986). Avian clinical haematology and blood chemistry. Zoo and wild animal medicine. 2nd ed. Saunders company, Philadelphia. p. 263-276
- ✓ **Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L. and Bompeix, G.** (2008). *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, p. 13-9.
- ✓ **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 absorbent materials. *Food Chem. Toxicol.* **42**(5), p. 817-824.

- ✓ **Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., and Visconti, A.** (2005). "Recent Advances on the Use of Adsorbent Materials for Detoxification of Fusarium Mycotoxins." *Food Addit. Contam.* **22** (4), p. 379–88.

B

- ✓ **Bager, F., Madsen, M., Christensen, J. and Aarestrup, F.M.** (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* **31**, p. 95-112.
- ✓ **Bailey, C. A., Latimer, G. W., Barr, A. C., Wagle, W. L., Haq, A. U., Balthrop, J. E., Kubena, L. F.,** (2006). Efficacy of Montmorillonite Clay (NovaSil PLUS) for Protecting Full-Term Broilers from Aflatoxicosis. *Poult. Res.* **15**, p. 198–206.
- ✓ **Barrios, M. J., Gualda, M. J., Cabanas, J. M., Medina, L. M. and Jordano, R.,** (1996). Occurrence of aflatoxin M1 in cheeses from the South of Spain. *J. Food Prot.* **59**, p. 898-900.
- ✓ **Bastiaanse, H. And Van Hove, F.** (2002). Caractérisation des espèces de champignons et de mycotoxines contaminant des ensilages en Belgique.
- ✓ **Bathily, A.,** (1998). Aflatoxine dans les aliments : Recherche et dosage dans les huiles de pression artisanale et leurs résidus d'extraction, essais de détoxification, Thèse de doctorat, Méd. Vét, Dakar, p. 112.
- ✓ **Bedford, M.** (2000). Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *World Poult. Sci. J.* **56**, p. 347-365.
- ✓ **Benkerroum, S. and Tantaoui-Elaraki, A.** (2001). Study of toxigenic moulds and mycotoxins in poultry feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire.* **152**, p. 335-342.
- ✓ **Bennett, J. W., Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbial. Rev.* **16**, p. 497-516.
- ✓ **Berek, L., Petri, I. B., Mesterhazy, A., Teren, J. and Molnar, J.** (2001). Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicol In Vitro.* **15**, p. 25-30.
- ✓ **Bernabucci, U., Colavecchia, L., Danieli, P.P., Basiricò, L., Lacetera, N., Nardone, A., Ronchi, B.** (2011). Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine periphe blood mononuclear cells. *Toxicol. In vitro.* **25**(3), p. 684-691.
- ✓ **Berroukech, F.** (2010). Effet de l'huile de coloquinte sur l'évolution pondérale et quelques paramètres biochimiques et hématologiques chez le rat male Wistar intoxiqué par le chlorure de cadmium (CdCl2). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en biologie et sante. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. p. 30-39.
- ✓ **Berthier, J., Valla, G.** (1998). Moisissures - Mycotoxines et Aliments : du Risque à la Prévention. Université Claude Bernard, Lyon. p. 05-20.
- ✓ **Betina, V.** (1994). Bioactive secondary metabolite of microorganisms. *Prog. Ind. Microbiol*
- ✓ **Bhat, P. V., Pandareesh, Khanum, F., and Tamatam, A.** (2016). Cytotoxic effects of Ochratoxin A in Neuro-2a cells: role of oxidative stress evidenced by N-acetylcysteine. *Front. Microbiol.* **7**, p. 1142.
- ✓ **Bhatti, S. A., Khan, M. Z., Hassan, Z. U., Saleemi, M. K., Saqib, M., Khatoon, A., and Akhter, M.** (2018). Comparative efficacy of Bentonite clay, activated charcoal and Trichosporon mycotoxinivorans in regulating the feed-to-tissue transfer of mycotoxins. *J. Sci. Food Agric.* **98**(3), p. 884-890.

- ✓ **Biró, K., Solti, L., Barna-Vetró, I., Bagó, G., Glávits, R., Szabó, E., and Fink-Gremmels, J.** (2002). Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathol.* **31**(2), p. 141-148.
- ✓ **Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J.** (2004). Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *J. Chromatogr. A.* **1054**, p. 397-401.
- ✓ **Bluma, R. V., and amp; Etcheverry, M. G.** (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol.* **25**(2), p. 324-334.
- ✓ **Bočarov-Stančić, A. S., Lopičić, Z. R., Bodroža-Solarov, M. I., Stanković, S. Ž., Janković, S. M., Milojković, J. V., and Krulj, J. A.** (2018). *In vitro* removing of mycotoxins by using different inorganic adsorbents and organic waste materials from Serbia. *Food Feed Res.* **45**(7), p. 87-96.
- ✓ **Boettger, D. and Hertweck C.** (2013). Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *Chem. BioChem.* **14**(1), p. 28-42.
- ✓ **Böhme, K., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P., and Aubourg, S. P.** (2014). Antibacterial, antiviral and antifungal activity of essential oils: Mechanisms and applications. In *Antimicrobial Compounds*. Springer, p. 51-81.
- ✓ **Bojja, R. S., Cerny, R. L., Proctor, R. H. and Du, L.** (2004). Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food. Chem.* **52**(10), p. 2855-2860.
- ✓ **Bondy et Pestka.** (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Environ. Health Part B.* **3**, p. 109-143.
- ✓ **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpen J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y and Veau P.** (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p. 34-428.
- ✓ **Bouafifssa, Y., Zinedine, A., Rahouti, M., Mañes, J. and Berrada. H.** (2016). Occurrence and multi-mycotoxin analysis in Moroccan pasta samples using a modified QuEChERS-based extraction and GC/ MS/MS. International Congress on Mycotoxins and Cancer. March 24-25, 2016. Marrakech, Morocco
- ✓ **Boudergue, C., Burel, C., Dragacci, S., Favrot, M. C., Fremy, J. M., Massimi, C. and Morgavi, D.** (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. *EFSA Supporting Publications.* **6**(9), p. 22E.
- ✓ **Boudine, L., Louaste, B., Eloutassi, N., Chami, N., Chami, F., and Remmal, A.** (2016). Antifungal activity of oregano essential oil and thymol against some fungi isolated from corn grains. *Inter. J. Innovation Appl. Stud.*, **17**(4), p. 1120.
- ✓ **Boudra, H** (2009). Les mycotoxines dans les fourrages : un facteur limitant insidieusement la qualité des fourrages et les performances des ruminants. *J. Fourrages.* **199**, p. 265-280.
- ✓ **Boukaew, S., Prasertsan, P., andamp; Sattayasamitsathit, S.** (2017). Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. *Ind. Crops Prod.* **97**, p. 558-566.
- ✓ **Braun, M.S., Wink, M.** (2018). Exposure, occurrence, and chemistry of Fumonisin and their cryptic derivatives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **17**(3), p. 769–791.

- ✓ **Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P. Adams, T. H. and Leonard, T. J. (1996).** "Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*." *PNAS*. **93**(4), p. 1418-1422.
- ✓ **Bueno, D.J., Di Marco, L., Olivier, G. And Bardon, A. (2005).** *In vitro* binding of zearalenone to different absorbents. *J. Food Prot.* **68**(3), p. 613-615.
- ✓ **Bullerman, L. B., Bianchini, A. (2007).** Stability of mycotoxins during food processing. *Inter. J. Food Microbiol.* **119**, p. 140-146.
- ✓ **Bulletin Officiel du Royaume du Maroc (Bulletin Officiel). (2016).** Arrêté conjoint du ministre de l'agriculture et de la pêche maritime et du ministre de la santé no. 1643-16 du 23 chaâbane 1437 (30 mai 2016) fixant les limites maximales autorisées des contaminants dans les produits primaires et les produits alimentaires. Le ministre de l'agriculture et de la pêche maritime, Le ministre de la santé, Rabat, Morocco.
- ✓ **Burns, R. P., et Dwivedi, P. (1986).** The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part II. Pathology and immunology. *World Poult. Sci.* **42**, p. 48-62.

c

- ✓ **Cairns-Fuller, V., Aldred, D. and Magan, N., (2005).** Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *J. Appl. Microbiol.* **99**, p. 1215-1221.
- ✓ **Camele I., De Feo V., Altieri L., Mancini E., De Martino L. and Rana G.L. (2010).** An Attempt of Postharvest Orange Fruit Rot Control Using Essential Oils from Mediterranean Plants. *J. Med. Food.* **13**, p. 1-9.
- ✓ **Campbell, T.W et Coles, E.H. (1986).** Avian clinical pathology. 4th Ed.; Saunders Company, Philadelphia. p. 279-301.
- ✓ **Canadas, D. (2006).** Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition subchronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués ? Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en Génie des procédés environnement. L'institut national polytechnique de Toulouse, France. p. 185-186
- ✓ **CAST. (2003).** Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems; Task Force Report 139; Niyo K, editor. Ames (IA). Council for Agricultural Science and Technology. p. 1–199
- ✓ **Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., (2002).** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. *La sécurité alimentaire du consommateur*. **2**, p. 127-79
- ✓ **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., (2006).** Les mycotoxines : Contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine In « Sécurité alimentaire du consommateur », 2^{ème} éd. Tec et Doc, p. 127-179.
- ✓ **Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Bouchikhi, T. and Remmal, A. (2005).** Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *S. cerevisiae*. *Phytother. Res.* **19**, p. 405-408.
- ✓ **Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Trouillas, J., Remmal, A. (2004 a).** Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *Int. J. Antimicrob. Chemother.* **54** (5), p. 909-914.
- ✓ **Chami, F., Chami, N., Bouchikhi, T., Bennis, S., and Remmal, A. (2004 b).** Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, p. 454-458.

- ✓ **Chapeland-Leclerc, F., Papon, N., Noël, T., and Villard, J.** (2005). Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicooses). *Revue Francophone des Laboratoires*. **373**, p. 61-66
- ✓ **Chattopadhyay, S.K, Taskar, P. K., Schwabe, O., Das, Y. T., Brown, H. D.,** (1985). Clinical and biochemical effects of aflatoxin in feed ration of chicks. *Cancer Biochem. Biophys.* **8**, p. 67-75.
- ✓ **Chelkowski, J.** (1998). Distribution of *Fusarium* species and their mycotoxins in cereal grains. In *Mycotoxins in agriculture and food safety*. *CRC Press*. p. 63-82
- ✓ **Cieplińska, K., Gajęcka, M., Nowak, A., Dąbrowski, M., Zielonka, Ł., and Gajęcki, M.** (2018). The genotoxicity of caecal water in gilts exposed to low doses of zearalenone. *Toxins*. **10**(9), p. 350.
- ✓ **Commission Recommendation (EU) 2016/1319** of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in *pet food*. *Offic. J. Eur. Union*. p. 58–60.
- ✓ **Creppy, EE., Kane, A., Giessen-Crouse, E., Roth, A., Röschenthler, R., Dirheimer, G.** (1986). Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells. *Arch. Toxicol. Suppl.* **9**, p. 310-400.
- ✓ **Creppy, E. E.** (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* **127**, p. 19-28.

D

- ✓ **Dakovic, A., M. Tomasevic-Canovic, V. S. Dondur, G. E. Rottinghaus, V. S. Medakovic, and S. Zaric.** (2005). Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids Surf. B.* **46**, p. 20–25.
- ✓ **Danicke, S., Gareis, M. and Bauer, J.** (2001). Orientation values for critical concentrations of deoxynivalenol and zearalenone in diets for pigs, ruminants and gallinaceous poultry. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **10**, p. 171–174.
- ✓ **De Blas, J.C., Taboada, E., Mateos, G.G., Nicodemus, N. and Mendez, J.** (1995). Effect of substitution of starch for fiber and fat in isoenergetic diets on nutrient digestibility and reproductive performance of rabbits. *J. Anim. Sci.* **73** (4), p. 1131-1137.
- ✓ **De Mil, T., Devreese, M., De Baere, S., Van Ranst, E., Eeckhout, M., De Backer, P., and Croubels, S.** (2015). Characterization of 27 mycotoxin binders and the relation with *in vitro* zearalenone adsorption at a single concentration. *Toxins*. **7**(1), p. 21-33.
- ✓ **De Ruyck, K., De Bovre, M., Huybrechts, I., De Saeger, S.** (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutat. Res.-Rev. Mutat.* **766**, p. 32–41.
- ✓ **Debatty, M.,** (2000). Approche de la problématique des mycotoxines : Partie méthodologie analytique. Thèse de doctorat à l'Université Catholique de Louvain.
- ✓ **Denli, M. et Okan, F.,** (2006). Efficacy of different adsorbents in reducing the toxic effects of aflatoxin B1 in broiler diets. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **36**, p. 110-118.
- ✓ **Denli, M., Blandon, J.C., Guynot, M.E., Salado, S., Perez, J.F.,** (2009). Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1, *Poult. Sci.* **88**, p. 1444–1451.
- ✓ **Denli, M., Blandon, J. C., Guynot, M. E., Salado, S., and Perez, J. F.** (2008). Efficacy of a new ochratoxin-binding agent (Ocratox) to counteract the deleterious effects of ochratoxin A in laying hens. *Poult. Sci.* **87**(11), p. 2266-2272

- ✓ **Diaz, G.J.**, (2002). Evaluation of the efficacy of a feed additive to ameliorate the toxic effects of 4,15-diacetoxyscirpenol in growing chicks. *Poult. Sci.* **81**, p. 1492–1495.
- ✓ **Diaz, G.J., Squires, E.J., Julian, R.J., Boermans, H.J.** (1994). Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *Br. Poult. Sci.* **35**, p. 393-405.
- ✓ **Diaz-Llano, G. et Smith, T. K.** (2006). Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts. *J. Anim. Sci.* **84**, p. 2361-2366.
- ✓ **Djerou, Z.** (2006). Influence des conditions d'élevage sur les performances chez le poulet de chair. Mémoire de Magister en médecine vétérinaire. Université Mentouri de Constantine. p. 112
- ✓ **D'Mello, J. P. F., C. M. Placinta, et A. M. C. MacDonald.** (1999). *Fusarium* mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**, p. 183-205.
- ✓ **Dragacci, S. and Frémy, J.**, (1999). Techniques pour la recherche des mycotoxines dans les aliments. In "Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion de risque". Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Section de l'alimentation et de la nutrition, Ed. TEC and DOC, p. 140-169.
- ✓ **Dugyala, RR., Sharma, RP.** (1996). The effect of aflatoxin B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, p. 599–608.
- ✓ **Duran, J.A., Malvar, A., Pereiro, M., Pereiro, Jr. M.**, (1989), *Fusarium moniliforme* keratitis, *Acta ophthalmol., Scand.* **67**, p. 710-713.
- ✓ **Duron, B.S.** (1999). Le Transport maritime des céréales. Mémoire de DESS Université d'Aix-Marseille.
- ✓ **Dutton, M.F.** (1996). Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects. *Pharmacol Ther.* **70**, p. 137-161.
- ✓ **Dwivedi, P. and Burns, R.B.** (1984). Pathology of ochratoxin A in young broiler chicks. *Res. Vet. Sci.* **36**, p. 92–103.

E

- ✓ **EFSA, European Food Safety Authority.** (2011). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J.*
- ✓ **EFSA.** (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed EFSA. *J European Food Safety Authority* No. **73**. P. 1-41.
- ✓ **El Golli-Bennour, E., Kouidhi, B., Bouslimi, A., S Abid-Esse, S., Hassen, W., and Bacha, H.** (2010). Cytotoxicity and Genotoxicity Induced by Aflatoxin B1, Ochratoxin A, and their Combination in Cultured Vero Cells. *J. biochem. Molecular. toxicol.* **24**(1), p. 42-45.
- ✓ **El Yassouri, A.** (2005). Etude de l'effet de la qualité de l'alimentation sur les performances de production et certains paramètres cliniques et biochimiques chez la volaille. Thèse vétérinaire Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc
- ✓ **Elaroussi, M. A., Mohamed, F. R., El Barkouky, E. M., Atta, A. M., Abdou, A. M., and Hatab, M. H.** (2006). Experimental ochratoxicosis in broiler chickens. *Avian Pathol.* **35**(4), p. 263-269

- ✓ **El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y.K., Haskard, C., Juvonen, R., Salminen, S., Mykknen, H.** (2004). Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Int.J. Agr. Food Chem.* **52**, p. 4577-4581.
- ✓ **Eskola, M.** (2002). Study on trichothecenes, Zearalenone and Ochratoxin A in finnish Cereals: Occurrence and Analytical Techniques. Academic dissertation.
- ✓ **European Commission (EC).** (2006). Commission Regulation No. 1881/2006 of December 19th setting maximum levels of certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L.* **364**, p. 5-24.
- ✓ **European Commission (EC).** (2010). Commission Regulation (EC) No. 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Official Journal of the European Union L.* **50**, p. 8-12.
- ✓ **European Food Safety Authority (EFSA) (2013).** Deoxynivalenol in food and feed: Occurrence and exposure. *EFSA J.* **11**, p. 3379.



- ✓ **FAO, Food and Agriculture Organisation of United Nations.** (2015). Passerelle sur l'aviculture et les produits avicoles. <http://www.fao.org/poultry-production-products/production/especes-de-volaille/fr/>
- ✓ **FAO, Food and Agriculture Organisation of United Nations.** (2017). Perspectives agricoles de l'ocde et de la FAO 2017-2026. <http://www.fao.org/3/a-BT089f.pdf>
- ✓ **Fernandez., V., Ruiz., M.** (2003). Técnico en ganadería, Volume 1. Técnico en ganadería, Volume 1. Editeur : Culural. p. 556.
- ✓ **Ferrara, M., Gallo, A., Scalzo, R.L., Haidukowski, M., Picchi, V., Perrone, G.** (2015). Inhibition of ochratoxin a production in *Aspergillus carbonarius* by hydroxycinnamic acids from grapes. *World Mycotoxin J.* **8**, p. 283–289.
- ✓ **Fink-Gremmels, J.** (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Vet. Q.* **21**, p. 115-120.
- ✓ **Firmin, S.** (2011). Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II). p. 192.
- ✓ **Flamini, G. and Luigi Cioni, P.** (2003). Activity of Plant Extracts, Essential Oils, and Pure Compounds Against Fungi Contaminating Food stuffs and Causing Infections in Human Beings and Animals: A Six-Year Experience (1995-2000). Food products press. *Crop Sci.* p. 279-297
- ✓ **Food and Agriculture Organisation (FAO).** (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper No. **81**. FAO, Rome, Italy
- ✓ **Fowler, J., Li, W., and Bailey, C.** (2015). Effects of a calcium bentonite clay in diets containing aflatoxin when measuring liver residues of aflatoxin B1 in starter broiler chicks. *Toxins.* **7**(9), p. 3455-3464.
- ✓ **Fuchs, R.** (1988) Distribution and fate of ochratoxin A in experimental animals, Doctoral thesi., pp. 13-41 (Uppsala Sweden, Swedish University of Agricultural Science). p. 271.
- ✓ **Furukawa, T., and Sakuda, S.** (2019). Inhibition of Aflatoxin Production by Paraquat and External Superoxide Dismutase in *Aspergillus flavus*. *Toxins.* **11**(2), p. 107.

G

- ✓ **Garcia, A. R., Avila, E., Rosiles, R., and Petrone, V. M.** (2003). Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. *Avian dis.* **47**(3), p. 691-699
- ✓ **Gaumy, J. L., Bailly, J. D., Burgat, V. and Guerre, P.** (2001). Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Revue Méd. Vét.* **3**, p. 219-234.
- ✓ **Gelderblom, W.C., Lebepe-Mazur, S., Snijman, P.W., Abel, S., Swanevelder, S., Kriek, N.P., and Marasas, W.F.** (2001). Toxicological effects in rats chronically fed low dietary levels of fumonisin B1. *Toxicol.* **161**, p. 39-51.
- ✓ **Gentles, A., E.E. Smith, L.F. Kubena, E. Duffus, P. Johnson, J. Thompson, R.B. Harvey, and T.S. Edrington.** (1999). Toxicological evaluations of cyclopiazonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poult. Sci.* **78**, p. 1380-1384.
- ✓ **Glenn, A. E.** (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137**, p. 213-240.
- ✓ **Gordon, S.H.** (1994). Effects of daylength and increasing daylength programmes on broiler welfare and performance. *World's Poult. Sci. J.* **50**, p. 269–282.
- ✓ **Guarro, J., Gene, J.,** (1992). *Fusarium* infections, Criteria for the identification of the responsible species. *Mycoses.* **35**, p. 109-114.
- ✓ **Guerre, P., Galtier, P. et Burgat, V.** (2000). Le métabolisme : un facteur de susceptibilité à la toxicité des aflatoxines. *Int. Revue Méd. Vét.*, **147**, p. 879-92.

H

- ✓ **Hagler, W.A.** (2005). Mycotoxins: A review of dairy concerns. *Mid-south Ruminant Nutrition Conference.* p. 47-58.
- ✓ **Hajjaji, A., El Otmani, M., Bouya, D., Bouseta, A., Mathieu, F., Collin, S., and Lebrihi, A.** (2006). Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, p. 494-499.
- ✓ **Hameed, M. R., Khan, M. Z., Khan, A., and Javed, I.** (2013). Ochratoxin induced pathological alterations in broiler chicks: effect of dose and duration. *Pak. Vet. J.* **33**, p. 145-9.
- ✓ **Hamet, J.M** (1986). Les maladies métaboliques des oiseaux de cage et de volière. Données cliniques et physiopathologiques. Thèse Doc. Vet. Alfort. Paris France
- ✓ **Hamilton, P. B., W. E. Huff, J. R. Harris, and R. D. Wyatt.** (1982). Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poult. Sci.* **61**, p. 1832–1841.
- ✓ **Hanif N.Q., G Muhammad, M. Siddique, A. Khanum, T. Ahmed, J.A. Gadahai and G. Kaukab** (2008). clinico-pathomorphological, serum biochemical and histological studies in broilers fed ochratoxin A and a toxin deactivator (Mycofix® Plus), *Br. Poult. Sci.* **49**, p. 632-642,
- ✓ **Harvey, R.B., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Corrier, D.E. et Phillips, T.D.** (1994). Comparison of two hydrated sodium calcium aluminosilicate compounds to experimentally protect growing barrows from aflatoxicosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**, p. 88-92.

- ✓ **Harvey, R.B., Phillips, T.D., Ellis, J.A., Kubena, L.F., Huff, W.E. et Petersen, H.D.** (1991). Effects on aflatoxin M1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin contaminated diets of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* **52**, p. 1556-1559.
- ✓ **Hashem, M. and Alamri, S.** (2010). Contamination of common spices in Saudi Arabia markets with potential mycotoxin-producing fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* **17**, p.167-175.
- ✓ **Haskard, C., Binnion, C., Ahokas, J.** (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem. Biol. Interact.*, 128, p. 39-49.
- ✓ **Hatori, Y., Sharma, R.P., Warren, R.P.** (1991). Resistance of C57Bl/6 mice to immunosuppressive effects of aflatoxin B1 and relationship with neuroendocrine mechanisms. *Immunopharmacol.* **22**, p. 127–136.
- ✓ **Hennequin, C., Lavarde, V.,** (1998), Infections à *Penicillium*. *Encycl. Med. Chir.* (Elsevier, Paris), Maladies Infectieuses. p. 11-850.
- ✓ **Hennig, A., Fink-Gremmels, J., and Leistner, L.** (1991). Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. *IARC Scientific Publications.* **155**, p. 255- 260.
- ✓ **Hester, P.Y.** (1994). The role of environment and management on leg abnormalities in meat type fowl. *Poult. Sci.* **73**, p. 904-915.
- ✓ **Hochleithner, M.** (2013): Chapter 11: Biochemistries. In: Avian medicine online, by Harrison's bird foods. p. 223-245. www.avianmedicine.net/publication/chapter11-biochemistries/
- ✓ **Hong, JT, Par, KL, Han, SY, Park, KS, Lee, RD, Jang, SJ.** (2000). Effects of ochratoxin A on cytotoxicity and cell differentiation in cultured rat embryonic cells. *J. Toxicol. Environ. Health.* **61**, p. 609-621.
- ✓ **Houmairi, H. and Hicham, M.** (2015). Mycobiota composition and mycotoxins aflatoxin and ochratoxin A type of some spices in the central region of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* **6**, p. 877-884.
- ✓ **Hua, H.; Xing, F.; Selvaraj, J.N.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Zhou, L.; Liu, X.; Liu, Y.** (2014). Inhibitory effect of essential oils on *Aspergillus ochraceus* growth and ochratoxin A production. *PloS ONE.* **9**(9), p. 108-285.
- ✓ **Huff, W. E., L. F. Kubena, and R. B. Harvey.** (1988b). Progression of ochratoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* **67**, p. 1139–1146.
- ✓ **Huff, W. E., R. B. Harvey, L. F. Kubena, and G. E. Rottinghaus.** (1988a). Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poult. Sci.* **67**, p. 1418–1423.
- ✓ **Huff, W.E., Kubena, L.R., Harvey, R.B.** (1992). Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poult. Sci.* **71**, p. 64-69.
- ✓ **Hussein, S. H. Et Brasel, J. M.** (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.* **167**, p. 101-134.

J

- ✓ **IARC** (International Agency for Research on Cancer), (1993). IARC Monograph on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **56**, p. 489-521 (Lyon : IARC).
- ✓ **IARC, International Agency for Research on Cancer.** (2000). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. List of IARC evaluations, Lyon.

- ✓ **Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A L., Veneziano, A., Rastrelli, L.** (2011). Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products Imported in Italy. *Food Control*. **22**(12), p. 1905-1910.

J

- ✓ **Jacevic, V., Kuca, K., Milovanovic, Z., Bocarov-Stancic, A., Rancic, I., Bokonjic, D., ... and Segrt, Z.** (2018). Gastroprotective effects of amifostine in rats treated by T-2 toxin. *Toxin Reviews*. **37**(2), p. 123-127.
- ✓ **Jagadeesan, V., C. Rukmini, M. Vijayaraghavan, et P. G. Tulpule.** (1982). Immune studies with T-2 toxin: Effect of feeding and withdrawal in monkeys. *Food Chem. Toxicol.* **20**, p. 83-87.
- ✓ **Jard, G.** (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales : Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat de L'université de Toulouse France. **195**, p. 24-31.
- ✓ **Jayanthi, N., Manohar, B. M., Balachandran, C., Rao, S., Venkata, G., and Raj, G. D.** (2018). Influence of dietary culture material containing aflatoxin and t-2 toxin on growth rate and haematology in turkey poult (meliagridesgallopavo)-beltsville small white variety. *Inter. J. Sci. Envir. Technol.* **7**, p. 854 – 871
- ✓ **JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.** (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report. *WHO Technical Report Series*, Geneva, p. 47.
- ✓ **Jeff-Agboola, Y.A., Onifade, A.K., Akinyele, B.J. and Osho, I.B.** (2012). *In vitro* antifungal activities of essential oil from Nigerian medicinal plants against toxigenic *Aspergillus flavus*. *J. Med. Plants Res.* **23**, p. 4048-4056.
- ✓ **Jiang, N., Li, Z., Wang, Y., Wei, D., and Wang, M.** (2018). Advances in research on prevention and control of mycotoxins in agricultural products by ultraviolet radiation. *J. Food Saf. Qual.* **9**(22), p. 5799-5805.
- ✓ **Joo, Y. D., Kang, C. W., An, B. K., Ahn, J. S., and Borutova, R.** (2013). Effects of ochratoxin A and preventive action of A mycotoxindeactivation product in broiler chickens. *Veterinarija ir Zootechnika.* **61**(83), p. 22-29.
- ✓ **Jouany, J.P.** (2007). Vaches laitières et mycotoxines, l'étau se resserre. En attendant les outils de diagnostic. *PLM.* **383**, p. 46-48.
- ✓ **Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele, V., and Bartkevics, V.** (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT.* **89**, p. 307-314.

K

- ✓ **Kaldhusdal, M.** (2003). Maintaining gut health in meat-type poultry without antibacterial growth promoters and ionophores. In *Proceedings 14th European Symposium on Poultry Nutrition*, August 10-14, Lillehammer, Norway, p. 151-157.
- ✓ **Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Ramgaonkar, J. S., Sakhare, P. S., Warke, S., and Nigot, N. K.** (2005). Effect of polyherbal feed supplement “Growell “during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxinoses in broilers. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **18**, 3 p. 75-383.

- ✓ **Karolewicz, A., and Geisen, R.** (2005). "Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxine polyketide synthase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**(7), p. 588-595.
- ✓ **Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., Chanotiya, C. S., and Dubey, N. K.** (2014). Antifungal, antiaflatoxicogenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **89**, p. 29-36
- ✓ **Keller, N. P. and Hohn, T. M.,** (1997). Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genet. Biol.* **21**(1), p. 17-29.
- ✓ **Kensler, T. W., and Groopman, J. D.** (2018). Aflatoxin Exposure, Human Liver Cancer Risk, and Chemoprevention. *Carcinogens, DNA Damage And Cancer Risk.* p. 143-169.
- ✓ **Khaddor, M., Tantaoui-Elaraki, A., Behajib, A., Lamarti, A., Ezziyyani, M., Candela Castillo, M. E., and Badoc, A.** (2003). Destruction de l'aflatoxine M1 par les bactéries lactiques du lben marocain et du yaourt. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux.* **142**(1-4), p. 101-112.
- ✓ **Khalidi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. and Fedorova, N. D.** (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol.* **47**(9), p. 736-41.
- ✓ **Khanian, M., Karimi-Torshizi, M. A., and Allameh, A.** (2019). Alleviation of aflatoxin-related oxidative damage to liver and improvement of growth performance in broiler chickens consumed *Lactobacillus plantarum* 299v for entire growth period. *Toxicon.* **158**, p. 57-62.
- ✓ **Khatoon, A., and Abidin, Z.** (2018). An extensive review of experimental ochratoxicosis in poultry: I. Growth and production parameters along with histopathological alterations. *World's Poult. Sci. J.* **74**(4), p. 627-646.
- ✓ **Khatoon, A., Khan, M. Z., Khan, A., and Javed, I.** (2016). Toxicopathological and serum biochemical alterations induced by ochratoxin A in broiler chicks and their amelioration by locally available bentonite clay. *Pak. J. Agric. Sci.* **53**(4), p. 977-984.
- ✓ **Kichou, F. and Walser, M.M.** (1993). The natural occurrence of aflatoxin B1 in Moroccan poultry feeds. *Vet. Hum. Toxicol.* **35**, p. 105-108.
- ✓ **Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., and Fujimura, M.** (2007). Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**(9), p. 2105-23.
- ✓ **Kolosova, A., Stroka, J.** (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: A review. *World Mycotoxin J.* **4**, p.225–256.
- ✓ **Kong, C., Shin, S. Y., and Kim, B. G.** (2014). Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an *in vitro* approach. *SpringerPlus*, **3**(1), p.346.
- ✓ **Koynarski, V., S. Stoev, N. Grozeva, T. Mirtcheva, H. Daskalov, J. Mitev and P. Mantle.** (2007). Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria acervulina* in chicks simultaneously fed on ochratoxin A contaminated diet. *Res. Vet. Sci.* **82**, p.225-231.
- ✓ **Krska, R.** (2009). Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.* p.1203–1204.
- ✓ **Kubena, L. F., Harvey R. B., Huff W. E., Corrier D. E., Phillips T. D., Rottinghaus G. E.,** (1998). Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poult. Sci.* **69**, p.1078–1086.

- ✓ **Kubena, L.F., W.E. Huff, R.B. Harvey, D.E. Corrier, T.D. Phillips and C.R. Creger.** (1988). Influence of ochratoxin A and deoxynivalenol on growing broiler chicks. *Poult. Sci.* **67**, p. 253-260.

ℒ

- ✓ **Labrier, M. et Leclecq, B.** (1992). Nutrition et alimentation des volailles. INRA.Paris, p. 355
- ✓ **Labuda, R., Tancinová, D.** (2006). Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. *Ann. Agric. Environ. Med.* **13** (2), p. 193-200.
- ✓ **Lacassagne, L.** (1988). Alimentation des volailles : substituts au tourteau de soja, *INRA Prod. Anim.* **1**, p. 47- 57.
- ✓ **Le Bars, J., Le Bars, P.** (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987
- ✓ **Ledoux, D.R., A. J. Bermudez, G. E. Rottinghaus, and G. A. Bennett.** (1994). Individual and combined effects of feeding fumonisin B1 and moniliformin, supplied by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium fujikuroi* culture material, in the young broiler chick. *Poult. Sci.* **73**, p. 99.
- ✓ **Ledoux, D.R., Rottinghaus G.E., Bermudez A.J., Alonsodebolt M.,** (1998). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the effects of aflatoxin in broiler chicks. *Poult. Sci.* **78**, p. 204- 210.
- ✓ **Lee, L. S., J. J. Dunn, A. J. Delucca, and A. Ciegler.** (1981). Role of lactone ring of aflatoxin B1 in toxicity and mutagenicity. *Experientia* **37(1)**, p. 16-17.
- ✓ **Leeson, S., Diaz, G., Summers, J.D.,** (1995). Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario, Canada. p. 227–241
- ✓ **Lemke P.A., Davis N.D and Creechgregory W.,** (1989). Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species, applied and environmental microbiology. *Amer. Soc. Microbiol.* p. 1808-1810
- ✓ **Liu, B.H., Feng-Yih, Y., and Ming-Huan, C.,** (2002). The Effects of Mycotoxins, Fumonisin B1 and Aflatoxin B1, on Primary Swine Alveolar Macrophages. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.* **80(3)**, p. 197-204.
- ✓ **Liu, N., Wang, J., Deng, Q., Gu, K., and Wang, J.,** (2018). Detoxification of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and hydrated sodium calcium aluminosilicate in broiler chickens. *Livestock Sci.* **208**, p. 28-32.
- ✓ **Lopez de Cerain, A., Gonzalez-Penas, E., Jimenez, A.M., Bello, J.,** (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food. Addit. Contam.* **19**, p. 1058-1064.
- ✓ **Luchese, R.H., Harrigan, W.F.,** (1993). Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.* **74**, p. 5-14.
- ✓ **Lumsangkul, C., Chiang, H. I., Lo, N. W., Fan, Y. K., and Ju, J. C.,** (2019). Developmental Toxicity of Mycotoxin Fumonisin B1 in Animal Embryogenesis: An Overview. *Toxins.* **11(2)**, p. 114.
- ✓ **Luo, Y., Yoshizawa, T., Katayama, T.,** (1990). Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(12)**, p. 3723-3726.

- ✓ **Luongo, D., Russo, R., Balestrieri, A., Marzocco, S., Bergamo, P., and Severino, L.,** (2014). *In vitro* study of AFB1 and AFM1 effects on human lymphoblastoid Jurkat T-cell model. *J. immunotoxicol.* **11**(4), p. 353-358.

M

- ✓ **Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E. E., Ellouz, F., Bacha, H.,** (1996): Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon.* **34**, p. 535–540.
- ✓ **Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I., Chee-Sanford, J., Maxwell, S. and Aminov, R.I.** (2006) Tetracyclineresidues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities. *Anim. Biotechnol.* **17**, p. 157-76.
- ✓ **Mandiouba, C. G.,** (1992). Mycotoxines dans les aliments : Recherche et dosage de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A dans les échantillons de pâte d'arachide de niébé et mil recueillis dans le marché de Dakar, Thèse Pharmacie, UCAD de Dakar, p. 145
- ✓ **Mantle, P., Kulinskaya, E., Nestler, S.,** (2005). Renal tumourigenesis in male rats in response to chronic dietary ochratoxin A. *Food Addit. Contam., Suppl.* **1**, p. 58 –64.
- ✓ **Marin, S., Sanchis, V. and Magan, N.,** (1995). Water activity, temperature and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Can. J. Microbiol.* **41**, p. 1063-1070.
- ✓ **Marin, S., Sanchis, V., Saenz, R., Ramos, A. J., Vinas, I. and Magan, N.,** (1998). Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. From maize grain. *J. appl. Microbial.* **84** (1), p. 25-36.
- ✓ **Marin, D. E., Taranu, I., Burlacu, R. and Tudor, D. S.** (2010). Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicon.* **56**, p. 956-63.
- ✓ **Marin, D. E., Taranu, I., Burlacu, R., Manda, G., Motiu, M., Neagoe, I., Dragomir, C., Stancu, M. and Calin, L.** (2011). Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. *Toxicol. In Vitro.* **25**, p. 1981-8.
- ✓ **Maris, P.** (1989). Contrôle de la désinfection dans les bâtiments d'élevages avicoles. *Ann. Rech. Vét.* **20**, p. 309-317.
- ✓ **Marquardt, R. R., et Frohlich, A. A.** (1992). A review of recent advances in understating ochratoxicosis. *J Anim Sci.* **70**, p. 3968-3988.
- ✓ **Martinova, E.A., Merrill, A.H. Jr,** (1995). Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and immune function in BALB/c mice, *Mycopathologia.* **130**, p. 163-170.
- ✓ **Martrenchar, A. and Morisse, J.P.** (1997). La réglementation européenne en matière de production animale: enjeux et perspectives dans les filières poulet et dinde de chair. *Sciences et techniques avicoles*, **20**, p. 14-19.
- ✓ **McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C.W., Kendall, R.J., Wang, J S.** (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *Food Chem. Toxicol.* **44**(6), p. 868-876.
- ✓ **Meissonnier, G.M, Oswald1, I.P. et Galtier1, P.** (2005). Aflatoxicoses chez le porc - Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue Méd. Vét.* **156**, p. 591-605.
- ✓ **Meyer, A., Deiana, J. and Bernard, A.,** (2004). Cours de microbiologie générale. Doin. France. p. 388.

- ✓ **Mohaghegh, A., Chamanian, M., Shivazada, M., Sadeghia, A.A., Afzalib, N.** (2017). Effect of esterified glucomannan on broilers exposed to natural mycotoxin-contaminated diets. *J Appl. Anim. Res.* **45**, p. 285-291.
- ✓ **Molinié, A., and Pfohl-Leskowicz, A.** (2003). Les mycotoxines dans les céréales: les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire-Auzeville-Tolosane. Note de l'ASEDISSO No. Spécial Mycotoxines, 9.
- ✓ **Moon, E. Y., D. K. Rhee and S. Pyo.** (1999). *In vitro* suppressive effect of aflatoxin B1 on murine peritoneal macrophages functions. *Toxicol.* **133**, p. 171-179.
- ✓ **Moreau, C.,** (1994). Moisissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie. Pologne, p. 322.
- ✓ **Morin, O.,** (1994). *Aspergillus* et aspergilloses : biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses. p. 8600.
- ✓ **Multon, J.L.** (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique et Documentation, Paris Apria .p. 576
- ✓ **Murthy, P.S., Borse, B.B., Khanum, H., Srinivas, P.** (2009). Inhibitory effects of ajowan (*trachyspermum ammi*) ethanolic extract on *A. ochraceus* growth and ochratoxin production. *Turk. J. Biol.* **33**, p. 211–217.

N

- ✓ **Naeimipour, F., Aghajani, J., Kojuri, S. A., and Ayoubi, S.** (2018). Useful approaches for reducing aflatoxin M1 content in milk and dairy products. *Biomed. Biotechnol. Res. J.* **2**(2), p. 94.
- ✓ **Naidoo, V., McGaw, L.J., Bisschop, S.P., Duncan, N. and Eloff, J.N.** (2008). The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Int. J. Vet. Parasitol.* **153**, p. 214-219.
- ✓ **Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O.,** (1983). *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state University.
- ✓ **Nguyen, M. T.,** (2007). Identification des espèces des moisissures potentiellement productrices des mycotoxines dans les riz commercialisés dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, p. 147.

O

- ✓ **Ochieng, P. J., Okun, D., Mugenya, I., and Njagi, N. J.** (2016). *In Vivo* Toxicological and Histopathological Effects Of Aflatoxin B1 Exposure and Related Risk. *International Conference on Health and Well-Being.* p. 214-221.
- ✓ **Ogido, R., Oliveira, C.A.F., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., Correa, B., Butkeraitis, P., Reis, T.A, Goncales, E., and Albuquerque R.** (2004). Effects of Prolonged Administration of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 in Laying Japanese Quail. *Poult. Sci.* **83**(12), p. 1953-1958
- ✓ **Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H.** (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control.* **18**, p. 1518–1523.

- ✓ **O'Neill, K., Damoglou, A. P. and Patterson, M. F.,** (1996). The influence of gamma radiation and substrate on mycotoxin production by *Fusarium culmorum* IMI 309344. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**(5), p. 518-524.
- ✓ **Oswald, I.P., Desautels, C., Laffitte J., Fournout, S., Peres, S.Y., Odin, M., Le Bars, P., Le Bars, J., Fairbrother, J.M.,** (2003). Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(10), p. 5870–4.
- ✓ **Osweiler, G.D., Kehrli, M.E., Stabel, J.R., Thurston, J.R., Ross, P.F., Wilson, T.M.,** (1993). Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J. Anim. Sci.* **71**, p. 459-466.
- ✓ **Ouanes, Z., Abid, S., Ayed, I., Anane, R., Mobio, T., Creppy, E. E. and Bacha, H.** (2003). Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. *Mutat. Res.* **538**, p. 63-70.
- ✓ **Ouanes, Z., Ayed-Boussema, I., Baati, T., Creppy, E. E. and Bacha, H.** (2005). Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17beta-estradiol, progesterone and Vitamin E. *Mutat. Res.* **565**, p. 139-49.

P

- ✓ **Palmer, J. M., and Keller, N. P.** (2010). Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**(4), p. 431-436.
- ✓ **Pande, V. V., Kurkure, N. V., and Bhandarkar, A. G.** (2006). Effect of T-2 toxin on growth, performance and haematobiochemical alterations in broilers. *Indian J. Exp. Biol.* **44**, p. 86-88
- ✓ **Pappas, A. C., Tsiplakou, E., Georgiadou, M., Anagnostopoulos, C., Markoglou, A. N., Liapis, K., and Zervas, G.** (2014). Bentonite binders in the presence of mycotoxins: Results of *in vitro* preliminary tests and an *in vivo* broiler trial. *Appl. Clay Sci.* **99**, p. 48-53
- ✓ **Patil,** (2014). Mycotoxicosis and its control in poultry: A review. *J. Poult. Sci. Tech.* **2**(1), p. 1-10.
- ✓ **Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., Salminen, S.** (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* **84**, p. 2152-2156.
- ✓ **Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., and Pavlovic, M.** (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organisation*, **77**(9), p. 754-766.
- ✓ **Pestka, J. J., et G. S. Bondy.** (1994). Immunotoxic effects of mycotoxins. Thèse de la Faculté des sciences. Université Med V. Rabat.
- ✓ **Pestka, J.J., Smolinski, A.T.,** (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **8**, p. 39-69.
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R.A.** (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 61-99.
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A.,** (2001). Définition et origines des mycotoxines : Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. Tec and Doc, p. 3-14.
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A., Bartsch, H., and Azemar, B.** (2002). Mesna protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. *Facta Universitatis*. p. 9:57.
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A et Castegnaro, M.** (1999a). L'Ochratoxine A. Mycotoxines : Evaluation et gestion du risqué, chapitre 9, Lavoisier, Tec & Doc, (Paris). p. 249-278.

- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A.** (1999b). Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France. p. 17-29.
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A., and Manderville, R. A.** (2012). An Update on Direct Genotoxicity as a Molecular Mechanism of Ochratoxin A Carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, p. 252–262
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A., Bartsch, H., Azemar, B., Mohr, U., Estève J., and Castegnaro, M.** (2002a). MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. *Facta Universitatis.* **9**, p. 57-63.
- ✓ **Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., and Castegnaro, M.** (2002b). Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Add. Cont.* **19**, p. 282-302.
- ✓ **Phillips, T. D., Sarr, A. B. and Grant, P. G.** (1995). Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Nat. toxins.* **3**(4), p. 04-213.
- ✓ **Phillips, T. D., Clement, B. A., Kubena, L. F., and Harvey, R. B.** (1990a). Detection and detoxification of aflatoxins: Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Vet. Human Toxicol.* **32**, p. 15–19.
- ✓ **Phillips, T. D., Sarr, A. B., Clement, B. A., Kubena, L. F., and Harvey, R. B.** (1990b). Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin *in*: Pennington Center Nutrition Series Mycotoxins, Cancer, and Health. Louisiana State University Press, Baton Rouge, LA. **1**, p. 223–237
- ✓ **Pitt, J.** (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* **56**, p. 184–192
- ✓ **Pitt, J. I.** (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **149**(6), p. 479-492.
- ✓ **Pitt, J.I. and Hocking, A.D.** (1997) Fungi and food spoilage, 2nd ed. Academic Press, London, 593 p.
- ✓ **Pohland, A. E., Nesheim, S., and Friedman, L.** (1992). Ochratoxin A. Review. *Pure Appl. Chem.* **64**, p. 1029-1046.
- ✓ **Proctor, R. H., Brown, D. W., Plattner, R. D., and Desjardins, A. E.** (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* **38**(2), p. 237-49.
- ✓ **Proctor, R. H., Van Hove, F., Susca, A., Stea, G., Busman, M., Lee, T., Waalwijk, C., Moretti, A., and Ward, T. J.** (2013). Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Mol. Microbiol.* **90**(2), p. 290-306.

Q

- ✓ **Qu, D., Huang, X., Han, J., and Man, N.** (2017). Efficacy of mixed adsorbent in ameliorating ochratoxicosis in broilers fed ochratoxin a contaminated diets. *Ital. J. Anim. Sci.* **16**(4), p. 573-579.
- ✓ **Quillien, J.** (2002). Les mycotoxines. Le projet no QLK 1-CT-2000-00040. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

R

- ✓ **Raju, M. V., 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**, p. 640-650.
- ✓ **Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N.**, (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *Inter. J. Food Microbiol.* **106**, p. 291–296.
 - ✓ **Ramos, A.J., Magan, N., Sanchis, V.**, (1999). Osmotic and matric potential effects on growth, sclerotia and partitioning of polyols and sugars in colonies and spores of *Aspergillus ochraceus*. *Mycol. Res.* **103**, p. 141–147.
 - ✓ **Raper, K., Fennell, D.J.**, (1965). The genus *Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
 - ✓ **Reddy, K. E., young Jeong, J., Lee, Y., Lee, H. J., Kim, M. S., Kim, D. W., ... and Lee, S. D.** (2018). Deoxynivalenol-and zearalenone-contaminated feeds alter gene expression profiles in the livers of piglets. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **31**(4), p. 595.
 - ✓ **Remmal, A., Achahbar, S., Bouddine, L., Chami, N. and Chami, F.** (2011). *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet. Parasitol.* **182**, p. 121-126
 - ✓ **Reynier, C.** (2011). Faibles perturbations des transaminases en médecine générale : Analyse des pratiques et étude prospective descriptive des principales étiologies dans la région annécienne de mars à octobre. Thèse De Doctorat en médecine. Grenoble: Université Joseph Fourier. France. p. 175.
 - ✓ **Riba, A., Sabaou, N., Mathieu, F. and Lebrihi, A.** (2005). Premières investigations sur les champignons producteurs d’Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire, Fès
 - ✓ **RIDAF.** (2004). Réseau International pour le Développement de l’Aviculture Familiale, Bulletin RIDAF, **9**, 34 p.
 - ✓ **Robert, W. Mc. et Gerald, W. G.** (1983). Biochemistry: a fonctional approach. Ed. III, W.B Saubders Company, Philadelphia.
 - ✓ **Robertson, J.F., Wilson, D. and Smith, W.J.** (1990). Atrophic rhinitis: the influence of the aerial environment. *Anim. Prod.* **50**, p. 173-182.
 - ✓ **Robertson, J.H., and Friebe, W.R.** (1984) Microbial validation of vent filters. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, p. 828–835.
 - ✓ **Roe, M.T., and Pillai, S.D.** (2003). Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. *Poult. Sci.* **82**, p. 622-6.
 - ✓ **Roquebert, M.F.** (1998), Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d’observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, p. 39-95
 - ✓ **Rosenthal, E., Marty, P., Ferrero, C., le Fichoux, Y., Cassuto, J.P.**, (2000), Infection à *Penicillium marneffe* chez un patient infecté par le HIV, *Presse Med.* **29**, p. 363-364.
 - ✓ **Roskopf, W. J., Woerpel, R. W et Howard, E. B.** (1981). Chronic endocrine disorder associated with inclusion body hepatitis in a sulphurcrested cockatoo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **179**, p. 1273-1276.
 - ✓ **Roskopf, W.J., Woerpel, R.W., Roskopf, G., et Van De Water, D.** (1982). Hematologic and Blood chemistry values for common pat avian species. *Vet. Med. Sm. An. Clin.* **77**, p. 1233-1239.

- ✓ **Rotter, B.A., Thompson, B.K., Prelusky, D.B., Trenholm, H.L., Stewart, B., Miller, J.D., Savard, M.E.,** (1996). Response of growing swine to pure dietary fumonisin B1 during an 8 week period: growth and clinical parameters, *Nat. Toxins.* **4**, p. 42-50.
- ✓ **Rouvier, M.** (2002)). L'ochratoxine A : nature, origine et toxicité. Thèse de doctorat. Ecole National Vétérinaire.Toulouse. p. 144
- ✓ **Rouyn-Noranda.** (2005). Additifs et inhibiteurs de moisissures pour fourrages. Université du Québec.

S

- ✓ **Sadh, P. K., Duhan, S., and Duhan, J. S.** (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing.* **5**(1), p. 1.
- ✓ **Salah-Abbes, J. B., Abbes, S., Abdel-Wahhab, M. and Oueslati, R.** (2010). Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by *Raphanus sativus* extract. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **32**, p. 628- 36.
- ✓ **Salah-Abbes, J., Abbes, S., Houas, Z., Abdel-Wahhab, M. A. and Oueslati, R.** (2008). Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of radish extract (*Raphanus sativus*). *J. Pharm. Pharmacol.* **60**, p. 761- 70.
- ✓ **Saminathan, M., Selamat, J., Abbasi, P. A., Abdullah, N. and Zulkifli, I.** (2018). Effects of Nano-Composite Adsorbents on the Growth Performance, Serum Biochemistry, and Organ Weights of Broilers Fed with Aflatoxin-Contaminated Feed. *Toxins.* **10**(9), p. 345.
- ✓ **Samson, R.A., Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Thrane, U.** (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Int. J. Agric. Food Chem.* **14**, p. 9727-9732.
- ✓ **Sandhu, B.S., Singh, H., and Singh, B.** (1995). Pathological studies in broiler chicks fed aflatoxin or ochratoxin and inoculated with inclusion body hepatitis virus singly and in concurrence. *Vet. Res. Commun.* **19**, p. 27
- ✓ **Santin, E., Paulillo, A. C., Maiorka, P. C., Alessi, A. C., Krabbe, E. L., and Maiorka, A.** (2002). The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers. *Avian Pathol.* **31**(1), p. 73-79.
- ✓ **Santin, E., Paulillo, A.C., Nakagui, L.S.O., Alessi, A.C., Polveiro, W.J.C. and Maiorka, A.** (2003) Evaluation of cell wall yeast as adsorbent of ochratoxin in broiler diets. *Inter. J. Poultr. Sci.* **2**, p. 372–378.
- ✓ **Santurio J.M., Mallmann C.A., Rosa A.P., Appel G., Heer A., Dageforde S. et Bottcher M.** (1999). Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *Br. Poult. Sci.* **40**, p. 115-9.
- ✓ **Sarandan, H. O. R. E. A., Decun, M. I. H. A. I., Paunescu, V., Ordodi, V., Bojin, F., Hutu, I., and Sarandan, M. I. H. A. I.** (2012). Deoxynivalenol and Ochratoxin A inactivation in broiler chickens' feed. *Rom. Biotechnol. Lett.* **17**(6), p. 7285
- ✓ **Schatzmayr, G., Heidler, D., Fuchs, E., T"aubel, M., Loibner, A.P., Braun, R. et Binder, E.M.,** (2004). A novel approach to deactivate ochratoxin A. Dans: Proceedings of the XIth International IUPAC Symposium on Myxotoxins and Phycotoxins, Bethesda, Maryland, May. p. 17–21.
- ✓ **Schatzmayr, G., Zehner, F., Täubel, M., Schatzmayr, D., Klimitsch, A., Loibner, A. P., and Binder, E. M.** (2006). Microbiologicals for deactivating mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**(6), p. 543-551.

- ✓ **Schollenberger, M., H.-M. Muller, M. Rüfle, S. Suchy, S. Planck, And W. Drochner, (2005).** Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed In Germany. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, p. 317-326.
- ✓ **Seo, J. A., Proctor, R. H., and Plattner, R. D. (2001).** Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **34**(3), p. 155-65
- ✓ **Serrano, M.A., Martinez-Romero, D., Guillen, F., Valverde, J.M., Zapata, P.J., Castillo, S. and Valero, D. (2008).** The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, p. 464-471.
- ✓ **Shah, H.U., Simpson, T.J., Alam, S., Khattak, K.F., Perveen, S., (2010).** Mould incidence and mycotoxin contamination in maize kernels from Swat Valley, North West Frontier Province of Pakistan. *Food Chem. Toxicol.* **48**, p. 1111–1116
- ✓ **Sifou, A., Mahnine, N., Manyes, L., El Adlouni, C., El Azzouzi, M. and Zinedine, A. (2016).** Determination of ochratoxin A in poultry feeds available in Rabat area (Morocco) by high performance liquid chromatography. *J. Mater. Environ. Sci.* **7**, p. 2229-2234.
- ✓ **Sigamani, M.S., Ganne, V.S.R., (2010).** Effect of ochratoxin A on body weight, feed intake and feed conversion in broiler chicken. *Vet. Med. Int.* p. 1-4.
- ✓ **Silvério, A., Lopez, M. M., and de Freitas, G. (2010).** Determination of fungal contamination, aflatoxin B1 and ochratoxin A content in peanuts available in Portuguese market, *J. Biotechnol.*, **150**, 305.
- ✓ **Smith, E.E., Phillips, T.D., Ellis, J.A., Harvey, R.B., Kubena, L.F., Thompson, J. et Newton, G. (1994).** Dietary hydrated sodium calcium aluminosilicate reduction of aflatoxin M1 residue in dairy goat milk and effects on milk production and components. *J. Anim. Sci.* **72**, p. 677-682.
- ✓ **Snini, S., (2014).** Éluclation de la voie de biosynthèse d'une mycotoxine, la patuline: caractérisation du cluster de gène et étude de la régulation. *Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse France*.
- ✓ **Soleas, G.J., Yan, J., Goldberg, D.M. (2001).** Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection. *J. Agri. Food Chem.* **49**, p. 2733-2740.
- ✓ **Soriano, J. and Dragacci, S. (2004).** Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. *Food Res. Inter.* **37**, p. 367-374.
- ✓ **Speijers, G. J. A., and Speijers, M. H. M. (2004).** Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol. Lett.*, **153**(1), p. 91-98
- ✓ **Steyn, P.S. (1980).** The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism, Academic Press, INC
- ✓ **Stob, M., Baldwin, R. S., Tuite, J., Andrews, F. N. and Gillette, K. G. (1962).** Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature.* **196**, p. 1318.
- ✓ **Stoev, S. (2010).** Studies on Carcinogenic and Toxic Effects of Ochratoxin A in Chicks. *Toxins* **2**, p. 649 664.
- ✓ **Stoev, S. D., Djuvinov, D., Mirtcheva, T., Pavlov, D., and Mantle, P. (2002).** Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A toxicity in chicks. *Toxicol. Lett.* **135**(1), p. 33-50.

- ✓ **Stoev, S.D., Anguelov, G., Ivanov, I., Pavlov, D.** (2000). Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks. *Exp. Toxicol. Pathol.* **52**, p. 52: 43–55.
- ✓ **Stoev, S.D., Stefanov, M., Denev, S., Radic, B., Domijan, A-M., Peraica, M.,** (2004). Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicillic acid and intervention by natural plant extracts. *Vet. Res. Commun.* **28**, p. 727–746.
- ✓ **Stoev, S.D., Njobeh, P.B., Mosonik, J.S. M.F. Dutton, and Steenkamp, P.A.** (2010a). Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan Endemic Nephropathy. *Food. Addit. Contam.* **27**(1), p. 72-88.
- ✓ **Swamy, H. V. L. N., Smith, T. K., MacDonald, E. J., Boermans, H. J., and Squires, E. J.** (2002). Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent *J. Anim. Sci.* **80**(12), p. 3257-3267.

J

- ✓ **Tabuc, C.** (2007). Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'universite de Bucarest. p. 190
- ✓ **Tantaoui-Elaraki, A.** (1977). Production d'aflatoxines par des *Aspergillus* du Maroc. *Homme Terre et Eau.* **3**, p. 79-86.
- ✓ **Tantaoui-Elaraki, A., and Beraoud, L.** (1994). Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, **13**(1), p. 67-72
- ✓ **Tantaoui-Elaraki, A., Majdi, M., Dahmani, A. and Elalaoui, M.R.** (2000). Recherche des aflatoxines dans les aliments de l'Homme et du bétail distribués au Maroc. *Actes de l'Institut Agronomique et Vétérinaire.* **20**, p. 65-70.
- ✓ **Tedesco D., Tava A., Galletti S., Tameni M., Varisco G., Costa A., Steidler S.,** (2004). Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* **87**, p. 2239–2247.
- ✓ **Tesseraud, S. and Temim, S.** (1999). Modifications métaboliques chez le poulet de chair en climat chaud : conséquences nutritionnelles. *INRA Prod. Anim.* **12**, p. 353-363.
- ✓ **Trailović, J. N., Stefanović, S., and Trailović, S. M.** (2013). *In vitro* and *in vivo* protective effects of three mycotoxin adsorbents against ochratoxin A in broiler chickens. *Br. Poultr. Sci.*, **54**(4), p. 515-523.
- ✓ **Trenholm, H. L., Friend, D. W., Hamilton, R. M., Prelusky, D. B., et Foster, B. C.** (1989). Lethal toxicity and non-specific effects. Dans: V. R. Beasley (ed.) *Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiologic effects* CRC Press, Boca Raton, Fla. **1**, p. 107-142.

V

- ✓ **Valancony H., Balaine L. et Drouin P.** (1999). Influence du programme lumineux sur les performances des poulets de chair. *Compte rendu des 3èmes journées de la recherche avicole.* p. 45-48.

- ✓ **Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., et Theron, J. J.** (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*. **205**, p. 1112-1113.
- ✓ **Van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A.** (1994). Survey of data on the incidence and levels of Ochratoxin A in Food and animal feed worldwide. *J. Nat. Toxins*. **3**, p. 125-144.
- ✓ **Verdon-Delor, G., Raimbault, J. M.** (2006) – Mycotoxines : Guide d'utilisation des kits immunoenzymatiques format microplaques (kits ELISA) – IRTAC (Institut de Recherches Technologiques Agro-Alimentaires).
- ✓ **Verma, J., Johri, T. S., and Swain, B. K.** (2007). Effect of aflatoxin, ochratoxin and their combination on protein and energy utilisation in white leghorn laying hens. *J. Sci. Food Agric*. **87**, p. 760– 764.
- ✓ **Verma, J., Johri, T.S., Swain, B.K., Ameena, S.,** (2004). Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combination on the performance and immune response of broilers. *Br. Poult. Sci*. **45**, p. 512-518.
- ✓ **Verma, J., Swain, B. K., and Johri. T. S.** (2002). Effect of various levels of aflatoxin and ochratoxin A and combinations thereof on protein and energy utilization in broilers. *J. Sci. Food Agric*. **82**, p. 1412–1417.
- ✓ **Vias, G.** (1995). Contribution à l'étude comparée de la valeur nutritive du maïs (zea mays) et des sorghos (*Sorghum vulgare*) dans la ration des poulets de chair en zone tropicale sèche. Thèse, Méd., Vét. **7**, p. 57.
- ✓ **Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., and Solfrizzo., M.** (2008). Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Addit. Contam.* **25**, p. 193-202
- ✓ **Vlata, Z., Porichis, F., Tzanakakis, G., Tsatsakis, A. and Krambovitis, E.** (2006). A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.* **165**, p. 274-81.

W

- ✓ **Wang, A., and Hogan, N. S.** (2018). Performance effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on broiler chickens: Influences of timing and duration of exposure. *Anim. Nutr.* **5**(1), p. 32-40.
- ✓ **Whitlow, L.W. And W.M. Hagler, Jr.,** (2007). Mold and mycotoxin issues in dairy cattle: effects, prevention and treatment. North Carolina State University.
- ✓ **Whitlow, W. And W.M. Hagler.** (2001). Mycotoxin contamination of feedstuffs - An additional stress factor for dairy cattle. in 25^e symposium sur les bovins laitiers. October. Quebec.
- ✓ **WHO.** (2002). Food additive series 44, Zearalenone, WHO, Geneva, International Program on Chemical Safety.
- ✓ **Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Goliński, P., Waśkiewicz, A., Mirzwa-Mróz, E., and Wakuliński, W.** (2018). The risks of sweet corn and popcorn contamination by fumonisin FB1 produced due to *Fusarium verticillioides* infection. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, **17**(5).
- ✓ **Woo, C.S.J.; El-Nezami, H.** (2015). Mycotoxins in Asia: Is China in danger? *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods*. **7**, p. 3–25.

Y

- ✓ **Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.G., Bertin, G., Jeminet, G. et Jouany J.P.** (2004). Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* **67**(6), p. 1195-200.
- ✓ **Yiannikouris, A., Jouany, J. P.,** (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA. *Productions Animales.* **1**(15), p. 3-16.
- ✓ **Yoshizawa, T., Yamashita, A., Luo, Y.,** (1994), Fumonisin occurrence in corn from high and low areas from esophageal cancer in China, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, p. 1626-1629.
- ✓ **Yu, J.** (2012). "Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins.* **4**(11), p. 1024-1057.
- ✓ **Yu, J., Chang, P. K., Ehrlich, K. C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., Linz, J. E., Woloshuk, C. P., and Bennett, J. W.** (2004). "Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(3), p. 1253-62
- ✓ **Yu, J., Chang, P.K., Cary, J. W., Wright, M., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Payne, G. A., and Linz, J. E.** (1995). "Comparative mapping of aflatoxin pathway gene clusters in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*." *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(6), p. 2365-2371.

Z

- ✓ **Zhao, T., Shen, X. L., Chen, W., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., et al.** (2017). Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of Ochratoxin A. *Toxin Rev.* **36**, p. 39–44
- ✓ **Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V. and Miraglia, M.** (2006). Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *J. Food Control.* **17**, p. 868-874.
- ✓ **Zinedine, A., Fernandez-Franzon, M., Manes, J. and Manyes, L.** (2017). Multi-mycotoxin contamination of couscous semolina commercialized in Morocco. *Food Chem.* **214**, p. 440-446
- ✓ **Zinedine, A., Juan, C., Soriano, J.M., Molto, J.C., Idrissi, I. and Manes, J.** (2007b). Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feed from Rabat, Morocco. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, p. 124-127
- ✓ **Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C. and Manes, J.** (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **45**, p. 1-18.
- ✓ **Zinedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J.C., Bouclouze, A., Cherrah, Y., Idrissi, L., El Aouad, R. and Mañes, J.** (2007c). Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Addit. Contam.* **24**, p. 285-291.