

# Contamination de l'eau par des mycotoxines œstrogéniques

Période : septembre 2013 à novembre 2013

Annie PFOHL-LESZKOWICZ | leszkowicz@ensat.fr

Université de Toulouse, UMR CNRS/INPT/UPS 5503 – Laboratoire de génie chimique, département bioprocédés et Systèmes microbiens, UMR CNRS 5503. École Nationale supérieure agronomique de Toulouse – France

Mots clés : Agriculture, Eau, Élevage, Exposition environnementale, Moisissures, Mycotoxines, Poisson, Phytoœstrogène, Stations d'épuration, Toxines biologiques, Zéaralénone

Les moisissures (*Fusarium*, *Alternaria*, *Cladsporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) se développent sur les végétaux et, peuvent produire des mycotoxines<sup>(1)</sup> (trichothécènes<sup>(2)</sup>, fumonisines<sup>3</sup>, zéaralénone<sup>4</sup>, ochratoxines<sup>5</sup>, aflatoxines<sup>6</sup>). Si l'effet sur la santé animale et humaine résultant de l'ingestion, voire de l'inhalation de ces toxines est bien étudié (1) peu de travaux ont été réalisés pour évaluer le risque de contamination de l'eau par ces substances. Quelques études ont montré la présence notamment de *Fusaria* et de toxines associées comme les trichothécènes<sup>(2)</sup> dont la DON<sup>(7)</sup> et la ZEA<sup>(4)</sup> dans le sol, les tuyaux de drainage et les rivières (2-10). La ZEA est connue pour être un perturbateur endocrinien entraînant des troubles de la reproduction incluant féminisation, diminution de la libido, anovulation, perturbation de la spermatogénèse, infertilité... (11). Un impact sur le développement des poissons a été observé notamment chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (12-14) ainsi que chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (15). La recherche de plusieurs mycotoxines dans des échantillons d'eau collectée aux USA dans différentes rivières drainant des zones agricoles ainsi que dans des stations d'épuration fait l'objet de la première publication. Les auteurs de cette première publication proposent des hypothèses concernant les sources potentielles des toxines détectées. Certaines toxines recherchées (DON<sup>(7)</sup>,  $\alpha$  ZOL<sup>(8)</sup> et  $\beta$  ZOL<sup>(9)</sup>) ont été ainsi retrouvées dans plusieurs prélèvements dans différents sites à des concentrations excédant 100 ng/L. En matière d'écotoxicologie, la question concernant les effets d'une exposition à long terme à de faibles concentrations de mycotoxines, est posée. Dans ce contexte, la recherche de zéaralénone dans les tissus de truites arc-en-ciel, dans les aliments qu'elles reçoivent ainsi que dans l'eau dans laquelle elles sont élevées fait l'objet de la seconde publication.

## Les mycotoxines : Contributions diffuses ou ponctuelles de contaminants naturels préoccupants pour les cours d'eau

Kolpin DW, Schenzel J, Meyer MT, Phillips PJ, Hubbard LE, Scott T-M, Bucheli TD. Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. *Sci Total Environ* 2014;470-471:669-76.

### Résumé

L'objectif de cette étude était de rechercher des mycotoxines dans des échantillons d'eau collectés dans différentes rivières drainant des zones agricoles ainsi que dans des stations d'épuration. Cent seize échantillons d'eau ont été prélevés au niveau de 32 rivières et de trois effluents de stations d'épuration aux Etats-Unis. La présence de 33 mycotoxines, réparties en neuf groupes (incluant des trichothécènes, des aflatoxines, des zéaralénones, des ochratoxines, des alcaloïdes) ont été recherchées. Les prélèvements ont été réalisés dans deux régions agricoles : dans l'Iowa (au niveau de 17 rivières dont le Missouri et le Mississippi) et dans l'Indiana (au niveau de 3 rivières). Les prélèvements dans l'Iowa ont été réalisés régulièrement entre mars et novembre 2010 afin de pouvoir couvrir la période complète de croissance

et de récolte ; alors que dans l'Indiana les prélèvements ont eu lieu une fois en juillet et une fois en octobre. Les prélèvements au niveau des stations d'épuration (New York) ont été réalisés en amont et en aval de la station, ainsi qu'au niveau direct de l'effluent. Deux sites en zone forestière, loin de toutes activités urbaines et agricoles, ont aussi été échantillonnés (Montana et Wisconsin). Dans 94 % des échantillons, au moins une mycotoxine a été détectée. Les plus fréquentes sont la DON<sup>(7)</sup> et la NIV<sup>(10)</sup> (77 % et 59 %, respectivement). Dans 43 % des échantillons, il y a au moins un dérivé de la ZEA. Dix sur 11 des échantillons contenant de l'a ZOL<sup>(8)</sup> contiennent aussi de la b ZOL<sup>(9)</sup>. Vingt-huit échantillons sur 30 qui contiennent de la ZEA contiennent aussi de la DON. Dix-sept échantillons/1 044 contiennent des concentrations en DON >100 ng/L avec une valeur maximale de 1 662 ng/L ; six contiennent de l'a ZOL à des taux >100ng/L avec un maximum de 1 701 ng/L ; six contiennent de la b ZOL à des taux >100ng/L avec un maximum de 1 828 ng/L. Le nombre de mycotoxines détectées est plus élevé dans l'Iowa (neuf mycotoxines différentes) que dans l'Indiana (six mycotoxines), ce qui s'explique par le fait que l'Iowa est plus agricole, région dans laquelle il y a beaucoup de cultures de maïs, de soja et de fourrage, excellents substrats pour le développement de mycotoxines. La répartition des mycotoxines est assez homogène entre les différents sites de prélèvements

dans l'Iowa malgré les grandes variations des surfaces drainées. Seules deux mycotoxines ( $\alpha$  ZOL et  $\beta$  ZOL) sont présentes de manières très différentes suivant les sites de prélèvements. Elles sont retrouvées en quantité très importantes dans deux sites : à Clinton, rivière Mississippi et à Wapello, rivière Iowa. Cette contamination s'explique par la proximité d'un élevage, d'une zone de culture de maïs et d'une station d'épuration à proximité du point d'échantillonnage de Clinton, et d'un élevage à Wapello. Concernant la contamination en DON, elle augmente significativement au moment de la fonte des neiges. Ceci est dû à l'effet combiné du lessivage des terrains sur lesquels a été épandu du fumier, ainsi que la production accrue de cette toxine pendant l'hiver. En effet les conditions les plus favorables à sa biosynthèse sont des températures de 4°C (1). Le débit des cours d'eau joue aussi un rôle. Il y a une relation positive entre les concentrations en DON et NIV<sup>(10)</sup>, et le débit. Ce qui indique une pollution diffuse pour ces deux toxines. La  $\beta$  ZOL détectée dans tous les prélèvements du site de Wapello (Iowa) voit sa concentration baisser quand le débit augmente. Les auteurs expliquent ces résultats par une contamination ponctuelle liée au relargage par une usine de viande, d'effluents liquides dans l'Iowa. Aucun métabolite de ZEA ni la DON n'a été retrouvé à la sortie de station d'épuration utilisant de la boue activée alors que ces mycotoxines ne sont pas retenues par les stations d'épuration n'utilisant que la filtration. Aucune mycotoxine n'a été détectée dans les échantillons collectés dans les rivières localisées dans des zones forestières non exposées à des activités agricoles ou urbaines confirmant que l'origine des mycotoxines dans les autres régions est liée aux activités agricoles.

#### Commentaire

Cette étude montre que les cours d'eau peuvent être contaminés par des mycotoxines (trichothécènes et zéaralénone) provenant essentiellement des *Fusaria*. Bien que l'échantillonnage ne soit pas le même dans les deux régions il apparaît que la contamination par la DON est diffuse et plus prépondérante au printemps lors de la fonte des neiges. Les dérivés de zéaralénone constituent quant à eux une contamination ponctuelle liée d'une part à l'épandage de fumier dans lequel on peut retrouver les métabolites de la ZEA, mais également au fait que l' $\alpha$  ZOL est utilisée comme hormone de croissance (16). Le fait que l'on retrouve de la DON et des dérivés de la ZEA dans les effluents de certaines stations d'épuration pose le problème d'une éventuelle présence de ces mycotoxines dans l'eau de boisson. Ceci pointe une autre source d'exposition humaine aux mycotoxines que l'ingestion de céréales ou l'inhalation. Il est intéressant de noter que dans les stations d'épuration utilisant la boue activée, l'épuration de ces mycotoxines est nettement meilleure. Cette étude a permis de définir les sources de contamination dans les fleuves. La présence de mycotoxines à propriétés œstrogéniques peut être à l'origine de perturbations de la reproduction chez les poissons. L'ensemble de cette étude devrait permettre de proposer un certain nombre de moyens de prévention entre autres éviter l'utilisation de fumier d'animaux qui auraient été

traités par le  $\beta$  ZOL, hormone de croissance très fréquemment utilisée aux États-Unis, et généraliser l'utilisation de boue activée dans les stations d'épuration.

#### Contamination des truites arc-en-ciel d'élevage par la zéaralénone dans le nord-est de la Pologne

Wozny M, Obremski K, Jakimiuk E, Gusiatin M, Brzuzan P. Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland. *Aquaculture* 2013;416-417:209-11

#### Résumé

Afin de déterminer si la zéaralénone pouvait s'accumuler dans les organes de truites arc-en-ciel, la présence de ZEA dans différents organes provenant de trois fermes aquacoles en Pologne, a été analysée. Les organes retenus sont les muscles ainsi que la peau, le foie et la vésicule biliaire, les ovaires et la partie terminale de l'intestin avec son contenu. En parallèle, la nourriture et l'eau du circuit ont aussi été analysées. La ZEA a été extraite à partir d'un gramme d'organe, de 20 g de nourriture ou de 100 ml d'eau et purifiée sur colonne d'immunoaffinité. Les extraits ont été analysés par chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par fluorescence. La limite de détection est de 2  $\mu$ g/kg pour un taux de récupération de 85 %. Des traces de zéaralénone ont été observées dans le foie et les intestins des truites des trois fermes. Une quantité non négligeable de ZEA (7,1 + 3,2  $\mu$ g/kg) a été détectée dans les ovaires des truites ayant ingéré la nourriture la plus contaminée (81,8 + 25,8  $\mu$ g/kg). Bien que deux des trois fermes utilisent le même aliment, la quantité de ZEA dans les ovaires est significativement plus importante dans l'une que dans l'autre. Il n'y avait pas de ZEA dans l'aliment provenant de la ferme pour laquelle la ZEA n'avait pas été détectée dans les ovaires, alors que ce même aliment présentait plus de 10  $\mu$ g/kg dans l'autre ferme. Le circuit d'eau ne semble pas contenir de ZEA. Ceci montre que la principale source de contamination en ZEA de ces fermes aquacoles est les granulés utilisés pour nourrir les truites. La différence entre les deux élevages utilisant la même nourriture peut s'expliquer des deux manières : par l'hétérogénéité de la contamination d'un lot d'aliment ou par l'évolution de la contamination liée aux conditions de stockage de l'aliment.

#### Commentaire

Cette étude pointe du doigt le risque de contamination des poissons d'élevage par la zéaralénone, mycotoxine aux propriétés œstrogéniques, via l'utilisation de granulés contaminés, plutôt que par l'eau. L'exposition humaine à la ZEA par l'ingestion de ces poissons est limitée, car les quantités sont considérées comme faibles. Néanmoins, la limite de détection est relativement élevée. Ces quantités, bien que faibles, s'ajoutent aux autres sources d'exposition à cette toxine. Il est dommage que le taux de ZEA n'ait pas été mesuré dans la chair du poisson qui est la partie consommée par l'Homme. Cependant, cette étude montre clairement l'accumulation de la toxine dans les ovaires. Ceci

soulève le problème d'effets œstrogéniques qui peuvent survenir en aquaculture, mais aussi dans l'environnement puisque les poissons en milieu naturel peuvent aussi être exposés à la ZEA et/ou ses métabolites. Il est dommage que l'analyse n'ait porté que sur la ZEA et non pas sur ses métabolites ( $\alpha$  et  $\beta$  ZOL) (17) qui sont plus toxiques que la substance mère et qui sont certainement formés chez le poisson. L'analyse des ovaires de truites arc-en-ciel peut constituer un indicateur très sensible de contamination en ZEA d'un milieu aquatique et de présence potentiel de ZEA dans des poissons destinés à la consommation humaine.

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

Les mycotoxines sont des contaminants naturels, synthétisés par de nombreuses moisissures, dont certaines sont connues pour avoir des propriétés œstrogéniques. Ces mycotoxines, notamment les trichothécènes ainsi que la ZEA et ses métabolites, se retrouvent dans le milieu aqueux. Il a été montré que la contamination est soit diffuse, et donc plus importante lors du lessivage des sols au moment de la fonte des neiges entre autres, soit ponctuelle car liée notamment à l'utilisation de fumier d'animaux exposés. Les mycotoxines de sources ponctuelles (effluents contaminés) proviennent des activités agricoles (céréales et fumier) et activités humaines (effluent de station d'épuration et industries agroalimentaires). Elles ne sont éliminées que partiellement par certaines stations d'épuration. Les concentrations en mycotoxines dans les eaux et les organes de poissons sont relativement faibles, néanmoins elles participent à l'exposition à long terme. La compréhension des sources de contamination est nécessaire pour envisager des moyens de gestion avec amélioration des systèmes d'épuration. D'autre part, la mesure du taux de ZEA dans les ovaires de poissons, qui augmentent proportionnellement à l'exposition, peut constituer un biomarqueur d'exposition. Du point de vue écotoxicologique, il apparaît nécessaire de poursuivre les efforts de recherche concernant les effets d'une exposition à long terme à de faibles concentrations de mycotoxines.

#### GENERAL CONCLUSION

*Mycotoxins are natural compounds synthesized by fungi, some of which are known to be estrogenic. These mycotoxins, including trichothecenes and ZEA and its metabolites, are frequently detected in water. The contaminations are either diffuse, (and thus more important after thawing snow), or punctual related to the use of manure from exposed animals and point sources (liquid wastes...) They are due to both agricultural activities (crops residues and livestock manure) and human activities (waste water treatment plant effluent (WWTP) and food processing plants). The mycotoxins are only partially retained by WWTP. Concentrations in water and organs of fish are low, nevertheless, they contribute to long-term exposure. Understanding spatial and temporal occurrence is important for assessing risk, and define a better management of WWTP. In addition, measurement of ZEA in tissues of fish, which increase proportionally to exposure, can be a useful biomarker of exposure. From an ecotoxicological point of view, it seems important to improve risk assessment concerning long term exposure to low doses of mycotoxins.*

#### Lexique

- (1) Mycotoxine: Métabolites secondaires produits par les moisissures et ayant des propriétés toxiques pour les plantes et les animaux incluant l'Homme
- (2) Trichothécènes: Mycotoxines produites par des *Fusaria* (*F. sporotrichoides*), de structure terpénique. On distingue deux groupes: le groupe A possédant une chaîne aliphatique sur le carbone 8; le groupe B a une cétone au niveau du carbone 8. Elles sont responsables de dommages sur le système immunitaire
- (3) Fumonisines: Mycotoxines produites par *Fusarium moniliforme*, présentant une analogie de structure avec les sphingolipides. Elles sont responsables chez les équins de dégénérescence cérébrale, chez les porcs d'œdème pulmonaire et de cancers chez l'Homme
- (4) Zéralénone: Zéaralénone (ZEA), mycotoxine produite par des *Fusaria* (*F. graminearum* et *F. Sporotrichoides*). C'est une lactone macrocyclique dérivée de l'acide résorcyclique. Elle a des propriétés œstrogéniques entraînant des problèmes de reproduction chez les porcins notamment
- (5) Ochratoxine: L'ochratoxine A (OTA) est un dérivé isocoumarinique lié à la phenylalanine, produit par des *Aspergilli* et des *Penicillia*. Elle est à l'origine de néphrotoxicité chez tous les animaux et responsable de cancers des voies urinaires
- (6) Aflatoxines: Les aflatoxines (AF) sont des dérivés lactoniques, produits par des *Aspergilli*. Elles sont responsables d'hépatotoxicité et de cancers du foie

- (7) DON: Désoxynivalénol, trichothécène du groupe B appelé aussi vomitoxine
- (8)  $\alpha$  ZOL: Alpha zéaralénol, métabolite de la zéaralénone
- (9)  $\beta$  ZOL: Beta zéaralénol, métabolite de la zéaralénone
- (10) NIV: Nivalenol, trichothécène du groupe B

## Publications de référence

- (1) Pfohl-Leszkwicz A. Mycotoxines dans l'aliment : effet sur la santé humaine dans 'mycologie médicale' Christian Rippert (ed), Tec & Doc, Lavoisier, 2013 ; pp 160-214.
- (2) Hartmann N, Erbs M, Wettstein FE, et al. Environmental exposure to estrogenic and other myco- and phytotoxins. *Chimia* 2008;**62**:364-7.
- (3) Hartmann N, Erbs M, Forrer HR, et al. Occurrence of zearalenone on Fusarium graminearum infected wheat and maize fields in crop organs, soil and drainage water. *Environ Sci Technol* 2008;**42**:5455-60.
- (4) Bucheli TD, Wettstein FE, Hartmann N, et al. Fusarium mycotoxins: Overlooked aquatic micropollutants? *J Agric Food Chem* 2008;**56**:1029-34.
- (5) Kolpin DW, Hoerger CC, Meyer MT, et al. Phytoestrogens and mycotoxins in Iowa Streams: An examination of underinvestigated compounds in agricultural basins. *J Environ Qual* 2010;**39**:2089-99.
- (6) Schenzel J, Schwarzenbach RP, Bucheli TD. A multi residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. *J Agric Food Chem* 2010;**58**:11207-17
- (7) Schenzel J, Forrer HR, Vogelsang, et al. Mycotoxins in the environment: I production and emission from an agricultural test field. *Environ Sci Technol* 2012;**46**:13067-75.
- (8) Schenzel J, Hungerbühler K, Bucheli TD. Mycotoxins in the environment: II Occurrence and origin in Swiss river waters. *Environ Sci Technol* 2012;**46**:13076-84
- (9) Gromadzka K, Waskiewicz A, Golinski P, et al. Occurrence of estrogenic mycotoxin-Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Res* 2009;**43**(3):1051-9.
- (10) Maragos CM. Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. *Food Addit Contam Part B Surveillance* 2012;**5**(1):55-64.
- (11) Metzler M, Pfeiffer E, Hildebrand AA. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin J* 2010;**3**(4):385-401.
- (12) Bakos K, Kovacs R, Staszny A, et al. Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicol* 2013;**136-137**:13-21.
- (13) Schwartz P, Bucheli TD, Wettstein FE, et al. Life-cycle exposure to the estrogenic mycotoxin zearalenone affects zebrafish (*Danio rerio*) development and reproduction. *Environ Toxicol* 2011;**28**:276-89.
- (14) Schwartz P, Thorpe KI, Bucheli TD, et al. Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. *Sci Total Environ* 2010;**409**:326-433.

- (15) Wozny M, Brzuzan P, Wolinska L, et al. Differential gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and ovary after exposure to zearalenone. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2012;**156**:221-28.
- (16) Balter M. Scientific cross-claims fly in continuing beef war. *Science* 1999;**284**:1453-5.
- (17) Vadja AM, Barber LB, Gray JJ, et al. Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environ Sci Technol* 2008;**42**:3407-14.

## Autres publications identifiées

Oliveira BR, Barreto Crespo MT, San Romao MV, et al. New insights concerning the occurrence of fungi in water sources and their potential pathogenicity. *Water Res* 2013;**47**:6338-47.

L'étude porte d'une part sur l'identification des moisissures dans les eaux souterraines, les eaux de source et de surface, et d'autre part sur leur capacité à croître et être pathogène. L'identification a été réalisée par méthode classique (morphologie) et PCR (identification génétique). Les moisissures les plus fréquentes dans l'eau de boisson étaient les *Penicillia* (30 %) et les *Trichoderma*. Néanmoins, d'autres moisissures ont été identifiées (*Aspergillii*, *Cladosporium*, *Fusaria*...). Les deux tiers se développent à 30°C. *A. fumigatus*, *P. viridatum* et *Cunninghamella* se développent encore à 42°C. Ces moisissures peuvent produire des mycotoxines. L'étude ne prend pas en compte ce dernier point.

Al-Gabr HM, Zheng T, Yu X. Occurrence and quantification of fungi and detection of mycotoxigenic fungi in drinking water in Xiamen city, China. *Sci Tot Environ* 2013;**466-467**:1103-11.

Cette étude s'est intéressée à l'évaluation des moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans les eaux de surface, les eaux d'adduction, les citernes. La surveillance s'est déroulée sur une année. L'identification des souches a été réalisée par méthode classique (morphologie) et PCR (identification génétique). La fréquence de moisissures est plus importante dans les eaux de surface. Il y a une répartition différente dans les eaux de consommation en fonction de la saison. Les moisissures productrices d'aflatoxine sont retrouvées à l'automne (sep-nov) ; alors que celles produisant la fumonisine et les trichothécènes ont été isolées en novembre et décembre. Cette étude est complémentaire à la publication 1 analysée dans cette note.

Al-Gabr HM, Zheng T, Yu X. Inactivation of *Aspergillus flavus* in drinking water after treatment with UV irradiation followed by chlorination. *Sci Tot Environ* 2013;**463-464**:525-9.

L'étude portait sur l'efficacité de traitement de désinfection de l'eau (UV, Chloration) dans le but d'inactiver *Aspergillus flavus*, moisissure productrice d'aflatoxines pouvant contaminer l'eau de boisson. Il s'avère que le traitement combiné d'irradiation aux UV et chloration est nettement plus efficace que chaque traitement séparé.

Al-Gabr HM, Zheng T, Yu X. Efficacy of two chemical coagulants and three different filtration media on removal of *Aspergillus flavus* from surface water. *J Environ Sci* 2013 DOI:10.1016/S1001-0742(13)60408-8.

*Cette publication porte sur l'efficacité de diverses techniques de purification de l'eau pour éliminer Aspergillus flavus. Deux flocculants (le sulfate d'aluminium et le chlorure de fer) ont été testés, ainsi que trois types de filtrations : sur sable, sur charbon actif, sur céramique. Les études ont été réalisées sur de l'eau sur-contaminée en A. flavus et sur de l'eau de surfaces. Les deux coagulants sont efficaces pour éliminer A. flavus et diminuer la turbidité de l'eau. La filtration sur céramique est nettement moins efficace que les deux autres, aussi bien pour éliminer la moisissure que pour diminuer la turbidité.*

### Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêts ;
- avoir un ou plusieurs conflits d'intérêts.