

Les substances naturelles à effet oestrogénique dans l'alimentation des ruminants : revue de la littérature

DUQUESNOY N.

Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Département des Sciences fonctionnelles, Service de Physiologie de la Reproduction, Boulevard de Colonster, 20, Bât. 41, B-4000 Liège

Correspondance: Dr Natacha Duquesnoy - Tél.: +32 (0)4/366.41.67 - Fax : +32 (0)4/366.41.65 - Email: natacha.duquesnoy@ulg.ac.be

Résumé

Les perturbateurs endocriniens représentent une problématique de plus en plus d'actualité. En effet, ces substances montrent d'importantes répercussions sur la santé animale, sur les performances d'élevage et sur la production de denrées alimentaires d'origine animale destinées à la consommation humaine. Après avoir identifié les perturbateurs à effet oestrogénique d'origine naturelle susceptibles de se retrouver dans l'alimentation des ruminants et leurs origines, cette synthèse passera en revue les méthodes biologiques et analytiques d'identification et de quantification de ces substances. Les mécanismes d'absorption et de métabolisation seront ensuite décrits dans le cadre spécifique de la digestion des ruminants. Les effets favorables et défavorables de ces perturbateurs endocriniens sur l'organisme seront alors envisagés et illustrés pour différentes espèces de polygastriques (bovins et ovins) et de monogastriques (porcins et humains). Enfin la maîtrise de ces perturbateurs passera par l'étude des facteurs influençant le degré de contamination des produits destinés à l'alimentation animale et les moyens pratiques de prévention ou de diminution de ces contaminations.

INTRODUCTION

Les oestrogènes endogènes, oestrone, oestradiol et oestriol jouent un rôle primordial dans la physiologie de la reproduction animale en intervenant dans les processus d'ovulation, de fertilisation, d'implantation, de développement, de croissance mammaire et de lactation. De leurs propriétés découlent un certain nombre d'implications thérapeutiques en médecine vétérinaire : induction de l'oestrus, induction de l'avortement, traitement de l'incontinence urinaire ou traitement des pathologies prostatiques hyperplasiques. En outre, le développement de molécules de synthèse à effet secondaire oestrogénique a connu une grande expansion, au cours de ces 50 dernières années, dans le domaine de la production d'herbicides, de fongicides et d'insecticides. Ces substances ont, malheureusement, déjà montré leurs effets délétères sur la santé humaine (Dodge, 1998). Ainsi, on leur associe une recrudescence des cancers

du sein, de la prostate, des testicules et la chute de la fertilité masculine (Sharpe, 1998). Enfin, il existe des analogues oestrogéniques naturels plébiscités en médecine humaine pour leurs propriétés anti-cancéreuses, anti-arthérosclérotiques et comme thérapie alternative du syndrome lié à la ménopause (Head, 1997). Paradoxalement, ces substances sont considérées comme nocives en médecine vétérinaire puisqu'à l'origine de syndromes d'infertilité et d'infécondité bien décrits chez les ovins (*red clover syndrome*), chez les porcins (*swine oestrogenic syndrome*) et de troubles chroniques de la reproduction chez les bovins. De plus, suite aux différentes crises des années '70, '80 et '90 dans le secteur de la production de viande à destination de la consommation humaine, l'utilisation des hormones de synthèse (précisément : les stilbènes, la trembolone, le zéranol et l'acétate de mélangestrol) à titre de traitement zootechnique (promotion de la croissance) et à titre thérapeu-

tique (les stilbènes, le trembolone et le zéranol) est interdite dans les pays européens par la directive européenne 96/22/CE édictée par le conseil européen. Néanmoins, le zéranol et le trembolone restent toujours autorisés comme promoteur de croissance pour le bétail dans des pays tiers comme les Etats-Unis et le Canada (Organisation mondiale du commerce, 2006).

Les végétaux qui contiennent des phytoestrogènes (coumestrans, iso-flavones et lignans essentiellement) et les moisissures productrices de mycotoxines (zéaralénone, fusariotoxines...) représentent les deux principales sources de substances *estrogen like*. Les ruminants y sont fortement exposés puisque grands consommateurs de produits herbagers et céréaliers. De plus, les méthodes de conservation et de stockage favorisent l'apparition de mycotoxines. Cet article a pour but de faire le point sur les sources, la détermination quantitative, la métabolisation, les effets favorables et défavorables et la maîtrise de

ces molécules dans l'alimentation des ruminants.

1. SOURCES ET IDENTIFICATION DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

1.1. Les phytoestrogènes

Coumestrans, isoflavones et lignans forment les trois principales classes de phytoestrogènes. D'un point de vue chimique, c'est la présence et la position (4',7) de deux groupes hydroxyles qui déterminent l'activité oestrogénique de ces substances (figure 1). Ainsi le remplacement d'un de ces hydroxyles 7 ou 4' par des hydrogènes diminuent l'activité utéro-trophique (chez la rate) d'approximativement 15 %, alors que le remplacement simultané de ces deux sites supprime toute activité oestrogénique (Dodge, 1998). Le potentiel oestrogénique des coumestrans, évalué sur base de la capacité à induire une hypertrophie de l'utérus chez la rate, est approximativement de 0,001 % et celui des isoflavones de 0,0001 %, en se référant à l'action du 17 β -oestradiol (figure 2) (Adams, 1995). Les isoflavones sont largement répandus dans la famille des légumineuses avec des taux significativement élevés dans le soja, le trèfle et la luzerne (Saloniemi *et al.*, 1995). La daïdzéine et la génistéine y prédominent en quantité et en potentiel oestrogénique. A part quelques exceptions, la quantité de génistéine dépasse celle de daïdzéine. Les graines de soja sont une source majeure de daïdzéine et de génistéine jusqu'à 100 000-300 000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de matière sèche (MS) (Mazur et Adlercreutz, 1998). Ces deux isoflavones sont aussi abondantes dans les *ray-grass* mais principalement durant les premiers stades de la germination et ensuite de la croissance des végétaux. Par contre, on ne les retrouve pas dans la luzerne conservée sous forme de fourrages et dans les céréales. Le trèfle

rouge, agent responsable de la « clover disease » du mouton en Australie, contient des quantités de biochanine A et de formononétine avoisinant respectivement 30-35 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS et 40-45 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS (Mazur et Adlercreutz, 1998), deux précurseurs de la daïdzéine et de la génistéine. Le coumestrol est aussi présent dans la plupart des légumineuses mais en faible quantité soit jusqu'à 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS (Mazur et Adlercreutz, 1998).

Par contre, le coumestrol est plus abondant dans les luzernes dont la *Medicago sativa*, principale espèce cultivée en Europe, en moyenne 45 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS au stade de jeunes pousses (Mazur et Adlercreutz, 1998).

Enfin les lignans forment une catégorie particulière de phytoestrogènes représentés par le seco-isolariciresinol et le matairesinol. Chez l'homme, ces molécules nécessitent une transformation par la flore intestinale en entérodiol et en entérolactone pour exercer des effets similaires aux autres phytoestrogènes (Cassidy *et al.*, 2000). On ne connaît pas à l'heure actuelle, la capacité de la flore ruménale à métaboliser les lignans végétaux ni la capacité d'absorption de leurs métabolites par les parois ruménales. Le contenu en lignans des fourrages de légumineuses est faible et tourne autour de 19 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS (Mazur et Adlercreutz, 1998). Les graines de lin sont la source la plus riche de lignans avec des taux supérieurs à 360 000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS (Mazur et Adlercreutz, 1998). Après pression et élimination des graisses par solvant, cette concentration s'élève jusqu'à 600 000-700 000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS (Mazur et Adlercreutz, 1998). Ces différentes valeurs rapportées par Mazur et Adlercreutz (1998) sont quatre fois plus élevées que les valeurs rapportées généralement dans la littérature, ce qui serait dû à l'étape d'hydrolyse acide, dans le protocole de préparation des échantillons. Les céréales contiennent aussi des lignans

(par exemple 36 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS dans le grain entier de blé, 112 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS dans le grain entier de seigle et 13 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de MS dans la farine d'orge, Mazur et Adlercreutz, 1998). Les lignans se localisent dans les couches fibreuses externes de la céréale et majoritairement au niveau de l'aleurone. Cette couche fortement adhérente à la graine n'est pas éliminée par les traitements conventionnels comme l'éclatement, l'aplatissage ou le floconnage néanmoins elle est perdue lors du meulage et l'obtention de farine (Cassidy *et al.*, 2000). Enfin, les lignans sont structurellement très liés à cette membrane. Les réactions enzymatiques lors de la digestion chez les monogastriques ne permettent pas leur libération ; par contre on ne connaît pas le pouvoir de la flore microbienne du rumen à augmenter la disponibilité de ces molécules.

1.2. Les mycotoxines

Dans les élevages porcins, on a pu associer des épisodes répétitifs de retour en chaleurs, d'hyperoestrogénisme périnatal et prépubère à des rations à base de maïs contaminées par *Fusarium graminearum* : un champignon producteur de zéaralénone (ZEN). La ZEN est sans doute la mycotoxine la plus importante en ce qui nous concerne. De distribution mondiale, elle est souvent associée à une contamination du maïs par les *Fusariums* dont beaucoup d'espèces (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium crookwellense*...) sont capables de synthétiser de la ZEN (Placinta *et al.*, 1999). En Grande Bretagne, la presque totalité des échantillons de maïs prélevés était contaminée par la ZEN. Dans 40 % des cas, le taux de ZEN dépassait 1000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de poids frais (Scudamore *et al.*, 2000). Suite aux différents traitements technologiques du maïs, la ZEN se concentre de deux à sept fois suivant les fractions : gluten, fibre et germe. La fraction d'amidon ne contient pas de

Figure 1 : position 4' et 7 des groupements hydroxyle dans les molécules de génistéine (à gauche) et de coumestrol (à droite) (Dodge, 1998).

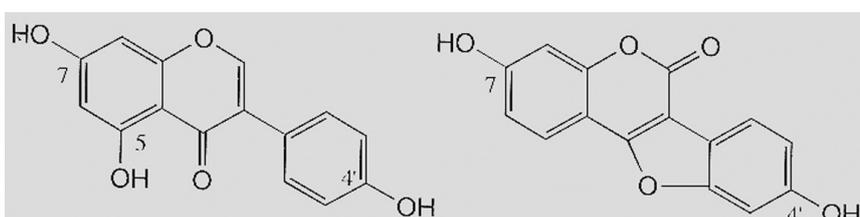
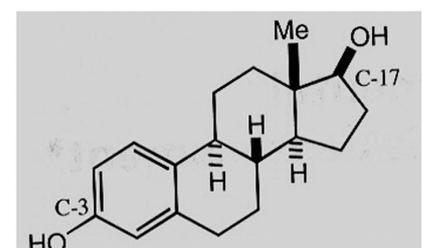


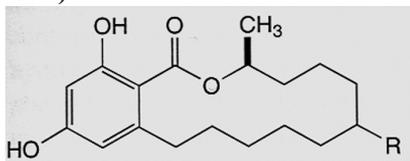
Figure 2 : 17 β -oestradiol (Beckers *et al.*, 2002).



quantités mesurables de ZEN (Bennett *et al.*, 1978). Enfin, on la retrouve également dans le sorgho, les graines de sésame, l'orge (par exemple : 4-90 µg/100 g de poids frais), le blé (par exemple : 20-1740 µg/100 g de poids frais) et l'avoine (par exemple : 160-290 µg/100 g de poids frais) (Tanaka *et al.*, 1990). La contamination d'oléagineux, de graines ou de tourteaux est limitée puisque les mycotoxines semblent être détruites lors de l'extraction des huiles et des traitements industriels (Scott, 1998).

Malgré leur apparente dissimilitude structurale avec les œstrogènes, les lactones macrocycliques (famille dont est issue la ZEN) possèdent un groupe hydroxyl phénolique (figure 3). Ce groupe est un site potentiel d'interaction avec les récepteurs des hormones oestrogènes (*Estrogen receptors* ou ERs) d'une manière similaire à l'hydroxyle 3' du 17 β-oestradiol. Ainsi, la ZEN se lie aux ERs dans un grand nombre de tissus cibles mais 20 fois moins que le 17 β-oestradiol (Dodge, 1998). Il existe aussi des différences d'affinité entre la molécule de ZEN parental et ses dérivés métaboliques. Ainsi l'α-zéaralénol montre une plus grande affinité pour les ERs que la molécule parentale. Elle est la seule à posséder une activité utéro-trophique chez la rate. La toxicité de la ZEN dépend donc de sa métabolisation par l'organisme consommateur (Dodge, 1998 ; Kennedy *et al.*, 1998 ; Malekinejad *et al.*, 2005).

Figure 3 : zéaralénone (R : carbonyle), α-zéaralénol (R : α-OH), β-zéaralénol (R : β-OH). (Richard, 1993)



2. MÉTHODES BIOLOGIQUES D'IDENTIFICATION DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

Dans les études biologiques, le poids de l'utérus de rate immature a été utilisé comme un indicateur des effets oestrogéniques des fourrages distribués comme aliments (Kallela, 1980). Comme la réponse utéro-trophique est très sensible et très rapide,

cette méthode est l'essai biologique de référence pour les composés oestrogéniques.

D'autres paramètres peuvent être utilisés : avortement, libido, volume testiculaire, fertilité des éjaculats, test au GNRH (*gonadotropines releasing hormone*)... pour mettre en évidence une activité oestrogénique. Par exemple, Ikeda et collaborateurs (2004) ont conclu que le coumestrol provoque l'activation anormale de facteurs vasoactifs dans l'utérus provoquant ainsi des interruptions de gestation. Administré à des rates suitées, le coumestrol diminue la libido et le volume des éjaculats des jeunes mâles sans entraîner de troubles chez la mère. Une toxicité de relais est donc possible dans certaines conditions.

3. MÉTHODES ANALYTIQUES DE QUANTIFICATION DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

3.1. Chromatographie liquide de haute performance

3.1.1. Dans l'alimentation des ruminants

Basée sur une procédure établie en 1984 par Pettersson et collaborateurs, les phytoestrogènes sont extraits par de l'éthanol et purifiés sur une cartouche Sep-Pak C18. Ils sont ensuite séparés, identifiés et quantifiés par un système de chromatographie liquide avec détection UV (ultra-violet, 254 nm) et/ou fluorescence. Cette méthode montre une limite de quantification de 2,5 ppm pour le coumestrol et 10 ppm pour les isoflavones.

Dans le cas de la zéaralénone, ce type de chromatographie associée à une détection par fluorescence (voir ci-dessous) est la méthode de choix. Les étapes préalables d'extraction et de purification ont été fortement développées au niveau des performances et de la rapidité d'exécution au cours de ces 20 dernières années. Ainsi après une phase d'extraction commune aux différentes méthodes au moyen de solvants organiques (mélange méthanol-acétonitrile le plus souvent) (Krska *et al.*, 2003 ; Pallaroni *et al.*, 2003), de nouvelles techniques comme l'extraction par colonne d'immunoaffinité (Visconti *et al.*, 1998) ou par micro-ondes (Pallaroni *et al.*, 2002) commencent à faire leurs

preuves. La zéaralénone possède une autre propriété importante : sa fluorescence. Elle apparaît d'une couleur bleu-vert lorsqu'elle est excitée par des longueurs d'onde élevées (360 nm), et d'un vert plus intense avec des longueurs d'ondes plus faibles (260 nm). Cette propriété est utilisée en chromatographie pour le dosage de la zéaralénone (Gaumy *et al.*, 2001). D'autres méthodes comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (SM) permettent de diminuer le seuil de quantification jusqu'à 1 ppb de zéaralénone (Schwadorf et Müller, 1992 ; Launeay *et al.*, 2004).

3.1.2. Dans les liquides physiologiques

Une méthode de chromatographie liquide avec détection UV ou fluorescence a été décrite pour le dosage de la daidzéine, de la formononétine et du coumestrol dans le plasma et l'urine de bovins (Lundh *et al.*, 1988). Ces deux types d'échantillon sont incubés au préalable, pendant 12 heures avec ou sans β-glucuronidase/sulfatase. Cette étape d'hydrolyse permet d'analyser à la fois les formes oestrogéniques conjuguées et libres. La méthode est suffisamment sensible pour doser des concentrations minimales de 0,1 ppm de coumestrol et 10 ppm d'isoflavones (Lundh *et al.*, 1988). Des méthodes similaires sont appliquées pour la ZEN. Ainsi, Olsen et collaborateurs (1985) déterminèrent par HPLC couplée à une détection par fluorescence des taux de ZEN dans le plasma et l'urine de rat de l'ordre de 5 ppm. Il est important de noter ici que la diversité des métabolites de la ZEN complique ces dosages.

L'HPLC et SM peuvent être couplées par l'électrospray-ionisation. Dans cette technique, à la sortie de la colonne HPLC, l'analyte est vaporisé sous forme de micro-gouttelettes chargées électriquement et ensuite évaporées en libérant des ions porteurs de multiples charges. Ces ions sont quantifiés par le spectromètre de masse et permettent de déterminer la masse moléculaire de l'analyte. Cette méthode complémentaire permet d'abaisser le seuil de détection en dessous du ppm. Par exemple, l'étude d'Antignac et collaborateurs (2003) a montré par cette technique des taux supérieurs à 1 ppm de phytoestrogènes ; principalement de l'équol, dans des échantillons de lait de vache.

3.2. Dosage radioimmunologique

Le dosage radioimmunologique (RIA) est une technique particulièrement pratique pour doser de faibles quantités d'analytes et pour des échantillons de faibles volumes comme les liquides physiologiques (sang, urine...). La compétition pour des anticorps entre l'analyte et un radio-ligand permet de quantifier la substance à doser.

C'est presque exclusivement dans le cadre de la détection du zéranol que la plupart des dosages radioimmunologiques ont été mis au point. Pour rappel, le zéranol est une substance oestrogénique synthétique dérivée de la ZEN utilisée comme anabolisant chez les animaux de rente et interdite d'utilisation à titre zootechnique ou thérapeutique en Europe (directive 96/22/CE édictée par le conseil européen). On a pu ainsi doser le zéranol dans des matrices aussi variées que le plasma, l'urine, la bile, les fèces et le lait. Thouvenot et collaborateurs (1982) ont développé un RIA utilisant des anticorps obtenus chez le porc qui présente une limite de détection de 5 ppm dans le sérum humain. A l'heure actuelle il est possible de trouver, dans le commerce, des anticorps de lapins dirigés contre la ZEN.

3.3. Dosage immunoenzymatique

Basés sur le même principe de compétition que les RIA, des tests immunoenzymatiques (EIA) ont été développés pour les isoflavones et la zéaralénone (Liu *et al.*, 1985). Grâce à la sélectivité des anticorps, ces deux dernières techniques (EIA et RIA) permettent d'envisager des étapes d'extraction et de purification simplifiées. Ces procédures sont en général utilisées pour le « *screening* » d'échantillons de manière à ne soumettre au travail laborieux d'analyse physico-chimique que les échantillons suspects.

Dans le cas de la zéaralénone également, la multiplicité des formes métaboliques entraîne des réactions croisées entre les molécules parentales et dérivées. Les méthodes de chimie analytique (HPLC, SM...) sont alors indispensables pour déterminer la présence des différents métabolites dans l'échantillon.

3.4. Les récepteurs essais

L'action des hormones stéroïdiennes est principalement médiée par des

récepteurs nucléaires spécifiques. Ces récepteurs appartiennent aux facteurs de transcription ligands-dépendants. Cette famille contient, entre autre, les récepteurs thyroïdiens, stéroïdiens, les récepteurs à la vitamine D3... L'utilisation de ces récepteurs pour le dosage d'hormones stéroïdiennes, utilisées illégalement comme promoteurs de croissance, a pris deux orientations dans le cadre du contrôle des produits destinés à la consommation humaine de denrées alimentaires d'origine animale et plus particulièrement de la viande. La première se base sur la liaison directe de l'hormone à son récepteur. Pour pallier aux difficultés inhérentes à l'utilisation de récepteurs naturels (lenteur et difficulté de préparation, stabilité très courte des préparations et faible degré de reproductibilité), Scippo et collaborateurs (2002) ont produit des récepteurs à oestrogènes humains par génie génétique dans une bactérie de type *Escherichia coli*. Ces récepteurs recombinants remplacent les anticorps utilisés classiquement en dosage radio immunologique et permettent de détecter une activité de type oestrogénique sans restriction de spécificité à une seule substance.

Dans la deuxième orientation, Willemsen et collaborateurs (2002) travaillent en aval de la liaison entre le récepteur et son ligand. En effet, lorsque l'hormone se lie au récepteur, celui-ci se dimérise, se fixe à des « *steroid response elements* » (SRE's) sur le promoteur du gène cible et active leur transcription. Si à la suite du promoteur de ce gène, on introduit un autre gène codant pour une activité de marquage telle que, par exemple, une luciférase, la présence de l'hormone activera le récepteur ce qui aboutira à l'expression du gène codant pour la luciférase. Cette activité devient alors indicatrice de la présence de l'hormone. Néanmoins, ces techniques restent d'interprétation difficile puisque spécifique d'une activité par exemple oestrogénique. Il faut donc pouvoir éliminer les interférences dues, en autres, au 17 β -oestradiol endogène. Ces technologies s'inscrivent donc dans des analyses multi-analytes où l'on cherche à détecter une classe de composés partageant les mêmes propriétés (Scippo *et al.*, 2004 ; Willemsen *et al.*, 2004). Elles s'avèrent donc très utiles dans les premières étapes de screening. Elles pourraient se révéler aussi très profitables pour déterminer le potentiel

oestrogénique d'une ration alimentaire distribuée permettant ainsi de faire la corrélation entre une expression clinique de type oestrogénique (voir ci dessous) et une contamination oestrogénique : par des phytoestrogènes, des mycotoxines ou un effet cumulatif entre les deux.

4. MÉTABOLISME ET ABSORPTION DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

4.1. Les phytoestrogènes

Les isoflavonoïdes comme la biochanine A et la génistéine sont transformés dans le rumen en para-éthylphénol inactif. Deux autres phytoestrogènes, la daidzéine et la formononétine, sont convertis par les micro-organismes du rumen en équol, molécule oestrogéniquement plus active et rapidement absorbée au travers de la paroi ruménale (Saloniemi *et al.*, 1995). Chez la vache, on observe un pic d'équol plasmatique 1 à 3 heures après l'ingestion d'une ration riche en phytoestrogènes (Lundh, 1995). Le coumestrol est absorbé et est actif comme tel (Saloniemi *et al.*, 1995). Les phytoestrogènes sont sous forme conjuguée en moyenne à 95 % dans le sang. Chez les ovins, les micro-organismes du rumen nécessitent 6 à 10 jours pour s'adapter pleinement à ces substrats, ainsi la génistéine et la biochanine A peuvent produire des effets oestrogéniques dans les premiers jours de l'introduction sur une nouvelle parcelle. Il existe une différence de sensibilité aux phytoestrogènes entre les moutons et les bovins. Ainsi des doses de 3 mg par jour de phytoestrogènes ingérés entraînent de l'infertilité permanente chez les brebis, des doses de 50 à 100 mg par jour ne semblent pas s'accompagner de conséquences cliniques chez la vache. Cette différence ne s'explique pas par des capacités de détoxification des phytoestrogènes, les ovins disposant d'un arsenal plus efficace pour la dégradation de ces molécules (Lundh, 1995). Cette différence pourrait s'expliquer par une concentration en récepteurs oestrogéniques au niveau de l'utérus deux à quatre fois plus importante chez le mouton (Lundh, 1995).

4.2. La zéaralénone

Dans le rumen des ovins, la ZEN est majoritairement transformée, soit à

plus de 90 %, en α -zéaralénol dont la toxicité est environ 10 fois plus forte que celle de la toxine mère et, à un degré plus faible, en β -zéaralénol qui est peu toxique (Mills *et al.*, 1996). Il existe ainsi deux orientations dans le métabolisme de la ZEN : l'activation en α et l'inactivation en β -zéaralénol. Kennedy et collaborateurs (1998) ont émis l'hypothèse de l'hydrogénation de l' α -zéaralénol et de la ZEN en zéranol dans le rumen des bovins puisque seulement une étape métabolique de réduction sépare l' α -zéaralénol du zéranol (ou α -zéaralanol) et 3 étapes dans le cas de la ZEN. Après une dose orale unique d' α -zéaralénol et de ZEN, on observe une augmentation des taux détectables de zéranol dans la bile des bovins (Kennedy *et al.*, 1998). Il est probable que l'environnement ruménal soit propice à ces transformations. Dans l'épithélium intestinal, les reins et surtout le foie, la ZEN subit l'action de réductases conduisant à la formation d' α et de β -zéaralénol. Malekinejad et collaborateurs (2005) ont montré que la biotransformation hépatique de la ZEN, *in vitro*, est orientée vers la formation de β -zéaralénol, c'est-à-dire la voie de l'inactivation. Dans le plasma, la ZEN est capable de se lier spécifiquement à des constituants cellulaires des globules rouges, permettant une large diffusion dans l'organisme (Galtier, 1998). Il existe une autre voie d'élimination par glucurono-conjugaison mais celle-ci semble faible chez les ruminants.

La ZEN et ses métabolites présentent un risque potentiel pour le consommateur du fait de leur excrétion dans le lait chez la vache. L'ingestion quotidienne de 544,5 mg de ZEN pendant 21 jours conduit à la présence de la toxine mère et d' α -zéaralénone dans le lait de vache avec un taux de transfert cumulé de 0,06 %. Celui-ci est fortement dépendant de la dose administrée puisqu'il passe à 0,0016 % et 0,008 % après une distribution de doses uniques de 1,8 g et de 6 g de ZEN (Prelusky *et al.*, 1990). Néanmoins les mesures du taux de transfert des toxines dans le lait ont été réalisées par ajout de toxines pures à la ration et l'étude ne comprenait que quatre animaux. Ce mode de distribution ne correspond pas aux conditions naturelles de contamination des aliments (Guerre *et al.*, 2000).

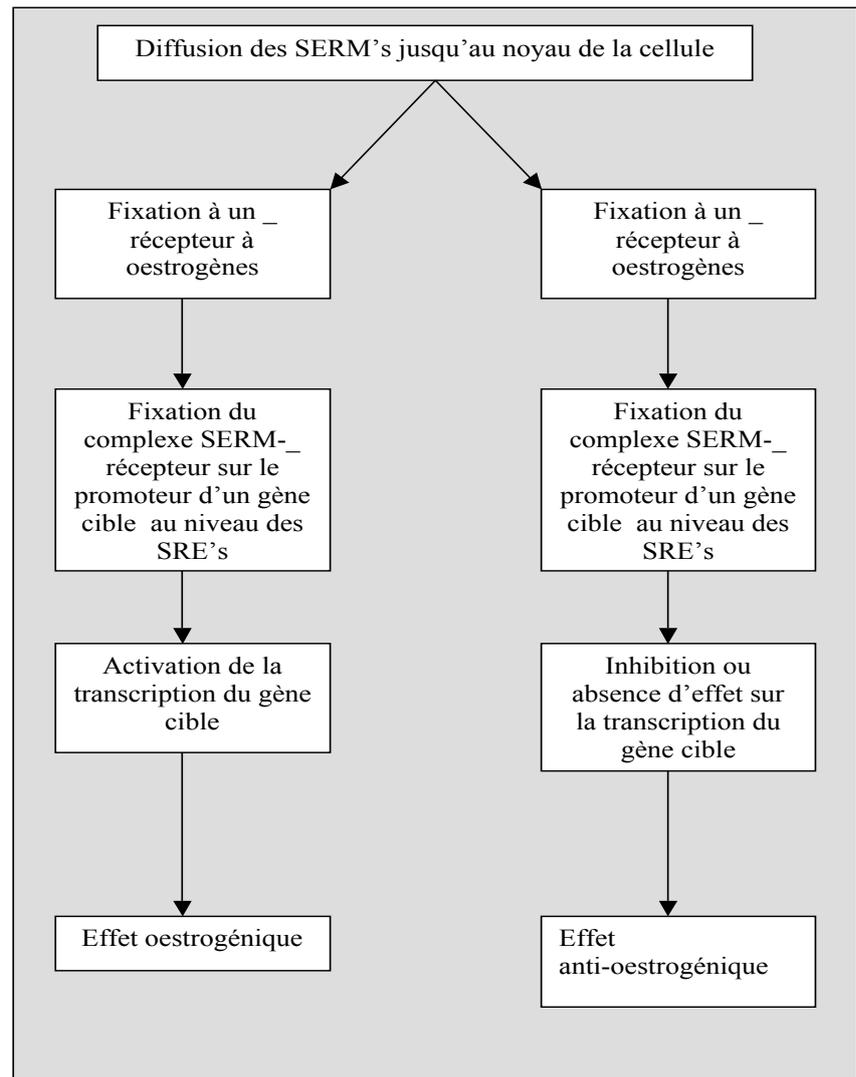
5. CONSÉQUENCES BIOLOGIQUES DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

5.1. Les conséquences favorables

Dans le domaine de la santé humaine, de multiples études épidémiologiques tendent à mettre en évidence une relation entre les régimes alimentaires riches en isoflavones et lignans et des taux faibles d'incidence de certains cancers (cancer du sein et de la prostate en particulier), de problèmes vasculaires et de symptômes ménopausiques. On leur attribue ainsi des propriétés anti-cancéreuses, anti-arthérosclérotiques et anti-oxydatives (Head, 1997). Dans ce contexte, la luzerne et le trèfle rouge sont utilisés sous forme

d'extrait ou de poudre comme supplément alimentaire ou nutraceutique. Des recherches actuelles (Cassidy *et al.*, 2000 ; Gutendorf et Westendorf, 2001 ; Diel *et al.*, 2004) suggèrent que les phytoestrogènes sont des modulateurs sélectifs des récepteurs à oestrogènes (SERM's). Ainsi en fonction de la concentration en oestrogènes endogènes et des types de récepteurs (α ou β récepteurs à oestrogènes) présents au niveau du tissu cible, les phytoestrogènes peuvent avoir des effets oestrogéniques ou anti-oestrogéniques. Les récepteurs α sont activateurs tandis que les récepteurs β sont inhibiteurs ou sans effet au niveau de la régulation qu'exercent les *steroids response elements* sur la transcription du gène situé en aval (figure 4). Gutendorf et Westendorf (2001) ont comparé les différentes affinités

Figure 4 : mode d'action des modulateurs sélectifs des récepteurs à oestrogènes (SERM's) et des steroid response elements (SRE's) (d'après Kleinsmith et al., 2005)



pour ces récepteurs : les phytoestrogènes ont une affinité de liaison quasiment identique pour les deux types de récepteurs mais une induction plus forte des gènes liés au récepteur β . En outre, il faut ajouter que la concentration en phytoestrogènes plasmatiques chez l'homme peut être 100 à 1000 fois supérieure à la concentration en œstrogènes endogènes et que la biodisponibilité varie d'une espèce de phytoestrogène à une autre en fonction de leur affinité variable pour les protéines plasmatiques de transport. Il faut garder à l'esprit qu'il existe une multitude d'études qui se contredisent et seulement des présomptions quand à l'efficacité de ces substances. Il est loin d'être établi que le soja ingéré par l'homme est anticancéreux. De même, il est loin d'être établi que le soja ingéré par les ruminants a une quelconque influence bénéfique sur la santé de l'homme. *In vitro*, les phytoestrogènes présentent néanmoins des propriétés intéressantes. Par exemple, la biochanine A et la génistéine inhibent la production de PSA (*prostatic sulphatase acid*, molécule utilisée comme marqueur de l'activité cancéreuse d'une cellule) à la fois dans des lignées de cellules cancéreuses au niveau de la prostate et du cerveau (Rosenberg, 2002). Quand la génistéine se lie à des récepteurs oestrogéniques β , la structure tridimensionnelle du complexe génistéine-récepteur est analogue à celle du complexe raloxifène-récepteur (Diel *et al.*, 2004 ; Kleinsmith *et al.*, 2005). La molécule de raloxifène est un SERM prescrit en cas d'ostéoporose.

5.2. Les conséquences défavorables

Les brebis exposées aux phytoestrogènes peuvent présenter deux types d'infertilité : une temporaire et une permanente. L'infertilité temporaire disparaît après 3 à 5 semaines de régime alimentaire pauvre en substance oestrogénique. La diminution de la fertilité se marque par une chute importante du taux de gémellité et une augmentation du taux de non ovulation. La mortalité embryonnaire semble augmenter légèrement. Elle serait due à des anomalies du transport de l'ovocyte dans l'oviducte et de la fonction utérine (Lundh, 1995). Il n'y a pas d'effets significatifs au niveau du système nerveux central (comportement et concentrations plasmatiques de lutéotropine). Les brebis montrent des modifications morphologiques

typiques d'une imprégnation oestrogénique (développement et sécrétion mammaire, gonflement vulvaire, écoulements vaginaux...) après une ingestion journalière de 3,5 g formononétine pendant 14 jours (Lundh, 1995). Enfin, une exposition prolongée peut causer une infertilité permanente par modification morphologique et histologique du col cervical et impossibilité pour ce dernier d'assurer le stockage et le transport des spermatozoïdes.

En Nouvelle Zélande, des taux élevés de ZEN (6 à 30 mg/kg) ont été mesurés dans des échantillons d'herbe au cours de périodes coïncidant avec le rut chez les ovins. Les moutons sont particulièrement sensibles à la ZEN. Une ingestion journalière de 6 mg pendant 40 jours entraîne une diminution de 40 % du taux d'ovulation (Smith et Towers, 1993). Néanmoins les effets de la ZEN semblent être restreints à la période de préfécondation. Des doses de 3 mg ou plus par brebis et par jour durant cette période déprime le taux d'ovulation (Smith *et al.*, 1990).

Chez le porc, il existe un syndrome périnatal d'hyperoestrogénisme bien connu. Les agents causals sont la F-2 toxine et la ZEN que l'on retrouve dans l'alimentation de ces animaux (voir ci-dessus). La maladie se marque par une chute du taux de fertilité et une augmentation du nombre de *repeat-breeders*. Les porcelets nouveau-nés et les fœtus mort-nés présentent des gonflements au niveau de la vulve, des mamelles et des infiltrations oedémateuses des régions ventrales qui évoluent vers de la nécrose. D'un point de vue histopathologique, on observe un élargissement des ovaires, de l'utérus avec des signes de maturation folliculaire, prolifération glandulaire de l'endomètre et prolifération épithéliale du vagin. Ces signes peuvent être induits expérimentalement en alimentant les truies gestantes avec un régime contenant de la ZEN (Smith, 2002).

Chez les bovidés, la toxicité des substances à effets oestrogéniques se manifeste généralement par des troubles chroniques. Ces effets sont dominés par des troubles de la reproduction et des modifications physiques des organes génitaux identiques à ceux de l'oestradiol : oedème et hypertrophie des organes génitaux des femelles prépubères, diminution du taux de survie de l'embryon chez les femelles en gestation, diminution des quantités de lutéotropine et de progestérone produ-

ites, modification de la morphologie des tissus utérins, diminution de la production de lait, féminisation des jeunes mâles par la diminution de la production de testostérone, infertilité et morbinatalité. En 1984, Kalella et collaborateurs imputent aux phytoestrogènes des manifestations de chaleurs faibles et irrégulières, anovulation, avortement, des vélages prématurés et des kystes ovariens dans un troupeau de bovins nourri à base d'un ensilage presque exclusivement composé de trèfle rouge.

Les mycotoxicoses chroniques surviennent le plus souvent chez les animaux à production élevée et sont parfois confondues avec des pathologies classiques chez ce type d'animaux. Mirocha et collaborateurs (1974) ont décrit une diminution de la production de lait résultant d'une contamination des céréales de la ration par la ZEN, alors que Shreeve et collaborateurs (1979) n'ont observé aucun effet lors de l'administration de ZEN à des concentrations allant de 385 à 1982 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans la ration pendant 7 jours. Il est à noter qu'une diminution des ingestions d'aliments se traduit inévitablement par une diminution de la production laitière. Enfin il semble que les génisses soient plus sensibles que les vaches (Weaver *et al.*, 1986). Zdunczyk et collaborateurs (2003) font correspondre à l'ingestion d'une grande quantité de substances oestrogéniquement actives, une augmentation du taux cellulaire du tank et de la fréquence des mammites subcliniques. D'autres facteurs sont encore à prendre en compte comme l'association à d'autres toxines, le type de régime et la sensibilité individuelle. Enfin l'utilisation, dans les années '80, d'implants à base de zéranol a permis de mettre en évidence les effets délétères de ce type de molécule sur la reproduction. Chez des taurillons implantés au zéranol, Staigmiller et collaborateurs (1985) ont observé une diminution de la circonférence scrotale, du poids des testicules, de la sécrétion de testostérone, du nombre d'animaux capables de produire un éjaculat à 14 mois et une augmentation des anomalies du pénis. Si ces perturbations sont réversibles après retrait de l'implant, la diminution de la qualité de la semence est persistante (Deschamps *et al.*, 1987). Cette dernière serait due à l'adénomyosis et à la formation de granulome dans la queue de l'épididyme sous l'action

du zéranol. En plus, d'autres effets oestrogéniques sont observés : diminution des alvéoles et augmentation du tissu conjonctif au niveau des vésicules séminales, métaplasie squameuse au niveau de la prostate. Chez le lapin, les concentrations les plus importantes en récepteurs à œstrogène se situent au niveau de la queue de l'épididyme (Deschamps *et al.*, 1987). Chez les génisses, les effets associés au zéranol sont variables d'une étude à l'autre : aucun, augmentation du diamètre pelvien (Staigmiller *et al.*, 1983 ; Deutscher *et al.*, 1986), augmentation de l'intensité des chaleurs prépubertaires, augmentation des chaleurs sans ovulation et diminution du taux de conception.

Bien que l'association entre l'exposition à la ZEN et des pathologies humaines reste spéculative à l'heure actuelle, la ZEN est considérée comme un des agents causals possibles avec les phytoestrogènes, les stéroïdes anabolisants et d'autres facteurs environnementaux de l'apparition de puberté précoce chez des milliers d'enfants à Puerto Rico au cours de ces 15 dernières années (Cassidy *et al.*, 2000). On la soupçonne aussi d'être impliquée dans le développement de certains cancers humains. La zéaralénone a été évaluée par le JECFA (*Joint FAO/WHO Committee on Food Additives*) en juin 2000. Le comité a conclu que sa sécurité pouvait être établie sur base de la dose qui n'a pas d'effet hormonal chez le porc. Il a été ainsi établi que la dose totale d'ingestion journalière, sans effet hormonal, est de 0,2 µg/kg de poids vif. Un facteur de sécurité de 1000 est ainsi appliqué puisque l'estimation de la consommation journalière moyenne au niveau européen est de l'ordre de 0,02 µg/kg poids corporel.

6. FACTEURS D'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

6.1. Les facteurs environnementaux

Les phytoestrogènes sont formés plus abondamment au printemps et en automne durant les périodes de croissance rapide des végétaux (Saloniemi *et al.*, 1995). Certaines souches fongiques sont phytopathogènes et susceptibles d'entraîner, lorsqu'elles se développent sur des organismes vivants, une synthèse anormalement

élevée de phytotoxines. Ce mécanisme de défense est aujourd'hui principalement impliqué dans une augmentation des teneurs des légumineuses en phytoestrogènes. Par exemple, le coumestrol se retrouve particulièrement dans des plantes atteintes de maladie des feuilles. D'autres facteurs de stress comme les variations brutales de température, les périodes de sécheresse ou de prolifération d'insectes pourraient favoriser la production de coumestrol (Seguin *et al.*, 2004).

6.2. Les techniques de culture

Des études ont souligné que la concentration en phytoestrogènes de la luzerne et du trèfle rouge est fortement affectée par le stade de maturité de la plante (Seguin *et al.*, 2004). Par exemple, dans le cas de la luzerne, le coumestrol et l'apigénine sont en concentration maximale aux stades végétatifs. De manière générale, il apparaît que les concentrations en phytoestrogènes sont minimales au stade « premières fleurs » (en moyenne 0,68 µg/100 g de matière sèche). De plus, les taux sont toujours plus importants lors de la première coupe. On peut donc s'attendre à des taux plus élevés dans les foins et les ensilages de première coupe. Par contre la répartition topographique des isoflavones oestrogéniques au sein de la plante est variable et spécifique de l'espèce des légumineuses (Seguin *et al.*, 2004).

En production de céréales, les champignons du groupe *Fusarium* survivent le plus souvent au sol sous la forme de spores, sur les résidus de la culture précédente, le maïs étant un précédent très favorable à la maladie (Vincelli, 2005). Les spores peuvent être transportées par le vent, par les éclaboussures de pluie et les insectes. L'introduction d'une dicotylédone (soja, pois, luzerne) dans la rotation de culture brise ce cycle. Ces champignons représentent un des pathogènes majeurs de la fusariose de l'épi. Le développement de la maladie nécessite des conditions particulières de températures (> 15°C) et d'humidité qui favorisent la germination et la dissémination des spores. L'infection se produit à un stade phénologique de la plante bien précis : la floraison. La fusariose cause, en conditions très défavorables, des pertes de rendement de 30 à 70 % de la récolte (Chandelier, 2003). Elle s'accompagne aussi d'un risque important de contamination par

des mycotoxines. Il faut signaler qu'il n'y a néanmoins pas de corrélation stricte entre l'observation des symptômes de fusariose de l'épi au champ et la présence de mycotoxines dans les grains récoltés. En effet, il existe un autre agent de la fusariose de l'épi, communément répandu en Belgique, *Microdochium nivale*, qui ne produit jamais de toxine (Chandelier, 2003). Il est dès lors nécessaire de réaliser une analyse en laboratoire pour poser un diagnostic étiologique. Enfin les *Fusarium* peuvent continuer de croître si les conditions de température (18°C à 30°C) et d'humidité leur sont favorables lors du stockage (Vincelli, 2005). Les fauches et récoltes rases des pailles, foins et surtout des fourrages destinés à être ensilés, favorisent leur contamination par des spores présentes dans le sol. La fragilisation voire la destruction des enveloppes protectrices des céréales au cours de la récolte ou en raison des nuisibles, permet la germination de ces spores. Les mulots et les campagnols en détruisant les bâches protectrices des ensilages vont créer des conditions d'aérobiose favorables à la multiplication fongique (Chandelier, 2003).

6.3. Les techniques de récolte

Les foins récoltés dans de bonnes conditions recèlent une flore équilibrée et limitée, résultant de la superposition progressive de trois types écologiques de champignon : flore de champ (pré-récolte), flore intermédiaire (en cours de récolte) et flore de stockage (conservation). C'est la flore de stockage qui est la plus soumise aux agents perturbateurs (Yiannikouris et Jouanny, 2002). Ainsi la ZEN est présente principalement dans le maïs mais aussi dans le sorgho, les graines de sésame, le blé et l'avoine, récoltés tardivement et sur des grains dont l'enveloppe externe a été abîmée.

6.4. Les techniques de conservation

Les pailles et les foins humides peuvent héberger *Fusarium*. Les principales espèces répertoriées après 2 ou 3 mois de conservation appartiennent aux trois genres *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* (Nout *et al.*, 1993). Il n'y pas de diminution de la teneur en ZEN lors de l'ensilage, celle-ci peut même augmenter lorsque le processus de fermentation n'est pas bien conduit. Bien qu'aérobique obligatoire, les champignons peuvent continuer à respirer à

des concentrations en oxygène aussi faible que 4 % (Nelson, 1993). Cette condition souligne l'importance du tassage lors de l'ensilage et d'une vitesse de désilage suffisamment grande pour que le front d'attaque c'est-à-dire la partie du silo en contact avec l'air soit proportionnellement faible.

Quand la matière ensilée est plus chaude ou plus froide que l'environnement, les moisissures migrent et se condensent à cause des mouvements de convection de l'air dans le silo. Des conditions de température non permissives, anaérobiose et diminution de l'eau active sont des stratégies disponibles pour contrôler la croissance des moisissures (Nelson, 1993). Les effets oestrogéniques des fourrages ensilés découlent bien sûr aussi de leur teneur en phytoestrogènes. En plus, il existe une corrélation significative entre la quantité d'acide lactique qui est un indicateur de la conservation de l'ensilage et l'expression des effets oestrogéniques ou des quantités d'isoflavones contenues dans l'ensilage (Nelson, 1993).

7. MAÎTRISE DES SUBSTANCES À EFFET OESTROGÉNIQUE

7.1. Les phytoestrogènes

Le contrôle de la contamination fongique peut être effectué en employant des variétés de plantes sélectionnées sur le critère de résistance aux moisissures.

7.2. La zéaralénone

On peut réduire la fusariose en adoptant des pratiques culturales adéquates. A titre d'exemple, il est recommandé d'utiliser des semences certifiées et d'éviter la verse. De plus, les grains atteints de fusariose sont souvent plus légers, il est donc possible de les éliminer au moment de la récolte en ajustant la ventilation de la moissonneuse-batteuse. Néanmoins, cette technique retourne le champignon au sol qui pourra s'attaquer à une culture de céréales l'année suivante (Chabot, 2003). En production de blé, l'application d'un fongicide sur les épis peut prévenir l'infection (Chabot, 2003). Le contrôle de la contamination fongique peut être effectué en employant des variétés de plantes sélectionnées sur le critère de la résistance aux moisissures

(Chabot, 2003).

Le séchage constitue une étape essentielle de la conservation des aliments secs et passe par le maintien d'un niveau d'humidité des céréales inférieur à 14 % (Diekman et Green, 1992). Le respect de l'anaérobiose, c'est-à-dire un taux en oxygène inférieur à 5 % (Diekman et Green, 1992), est primordial dans le cas d'aliments conservés sous forme ensilée humide.

Il existe des méthodes physiques d'élimination des mycotoxines comme le tri et le traitement des grains contaminés par le lavage, l'inactivation thermique, l'irradiation par UV, rayons X ou micro-ondes (Scott, 1998). De simples procédures de nettoyage, utilisant de l'eau ou des solutions de carbonate de sodium, réduisent les concentrations en mycotoxines de *Fusarium* (Scott, 1998). Mais les coûts de séchage associés sont prohibitifs. La zéaralénone est stable à très haute température. Les températures utilisées lors de ces processus de traitement des aliments n'offrent dès lors pas une bonne décontamination (Richard *et al.*, 1993). Les méthodes chimiques sont limitées puisqu'elles entraînent des risques de résidus et la modification des qualités nutritionnelles de l'aliment.

Les processus de transformation utilisés dans l'industrie des aliments pour animaux n'éliminent que très peu les mycotoxines. Le conditionnement et la mise en pellets ne diminuent pas la concentration de zéaralénone.

L'ajout d'adsorbants permet de réduire la biodisponibilité de la zéaralénone. Néanmoins ces argiles (aluminosilicates de sodium calcium hydratés, dérivés de zéolite, bentonites...) fixent essentiellement les aflatoxines. On reproche, aussi, à ces derniers d'occuper un volume important de la ration (0,5 à 2 %) avec pour effet d'en diluer la densité énergétique (Yiannikouris et Jouanny, 2002). En outre, leur manque de spécificité entraîne la perte d'autres éléments : minéraux, vitamines et acides aminés. Des composés chimiques permettent de dégrader ou de biotransformer des mycotoxines. Ils ont été développés plus particulièrement dans le cadre de la lutte contre les aflatoxines. Enfin de nouvelles technologies dans le domaine de la microbiologie commencent à arriver sur le marché. Ainsi il existe à l'heure actuelle des ligands naturels de mycotoxines. Ce

sont les glucomannanes, des composés issus de la paroi externe des levures *Saccharomyces cerevisiae* (Yiannikouris et Jouanny, 2002). Dans la nature, les propriétés d'adsorption des mycotoxines sont associées à un glucane d'origine naturelle : le glucane β 1,3. Ce glucide fibreux est résistant à la dégradation par les systèmes enzymatiques dans le tractus digestif de l'animal. Ce glucane est un matériau très structuré, composé de monomères de glucose qui forment de longues chaînes d'environ 1500 unités de glucose. Celles-ci forment une structure en triple hélice unique mais chimiquement versatile ayant une surface relativement importante. Après modifications de la structure de ce glucane, on ajoute des liaisons polaires et non polaires afin d'augmenter la liaison aux mycotoxines en nombre et en affinité (Yiannikouris et Jouanny, 2002).

CONCLUSION

Dans le contexte actuel d'animaux à très haute performance, des éléments perturbateurs, autrefois négligés, montrent un impact défavorable important. Malheureusement, il persiste un manque important de données globales comme l'ingestion totale journalière, le coefficient d'absorption, les voies métaboliques d'activation ou d'élimination *in vivo*. Réduit au stade d'hypothèses, le vaste domaine des analogues oestrogéniques reste à explorer. De plus, certains pesticides sont également des perturbateurs endocriniens qui risquent de contaminer les aliments pour animaux. Afin de garantir la sécurité des consommateurs, la directive 2002/32/CE du parlement européen et du conseil du 7 mai 2002 fixe des limites maximales autorisées de résidus, dans l'alimentation animale des animaux de rente, pour une mycotoxine (l'aflatoxine B1) et pour divers pesticides. Il ne faut donc pas douter que le domaine des perturbateurs endocriniens prendra une place de plus en plus importante vu ses implications dans les domaines de la productivité, de la santé publique et dans la pratique quotidienne de la gestion des élevages modernes.

Estrogen like substances in ruminant diets

Abstract

The endocrine disruptors are a more and more current problem because they have important repercussions in veterinary medicine by direct interference with animal health and breeding profitability. These factors have also important effects on human health by production of contaminated food. After a description of

the natural estrogen like substances found in ruminants diets, this article will review the biological and analytical methods of their identification and their quantification. The absorption mechanisms and the metabolism will be described in the ruminant's digestion specific context. The favorable and unfavorable effects of these disruptors upon the organism will be envisaged and illustrated in different polygastric (bovine, ovine and caprine) and mono-

gastric (porcine and human) species. Finally, the management will treat of the factors acting upon animal feed contamination and the practical methods of prevention and decrease of these contaminations.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS N.R. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**, 1509-1515.
- ANTIGNAC J.P., CARIOU R., LE BIZEC B., ANDRE F. Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography /electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, **17**, 1-9.
- BENNETT G. A., ANDERSON R.Z. Distribution of aflatoxin and/or zearalenone in wet-milled corn products. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **16**, 1055-1060.
- CASSIDY A., HANLEY B., LAMUELARAVENTOS R.M. Isoflavones, lignans and stilbenes : origins metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1044-1062.
- CHABOT V. La fusariose de l'épi des céréales. [en ligne] (sans date) Adresse URL : www.omafra.gov.on.ca/french/crops/pub811/6fusar.html Consulté le 08/05/05.
- CHANDELIER A. La fusariose de l'épi et les mycotoxines associées. [en ligne] (15/08/03) Adresse URL : http://www.sillonbelge.be/Sillon/Rubriques/Cultures/Cereales/Article_125522.shtml Consulté le 12/04/05.
- CONSEIL EUROPÉEN Directive 96/22/CE, du 29 avril 1996) concernant l'interdiction d'utilisation de certaines substances à effet hormonal ou thyrostatique et des substances β - agonistes dans les spéculations animales et abrogeant les directives 81/602/CEE, 88/146/CEE et 88/299/CEE. *Journal officiel n° L 125 du 23/05/1996, 0003-0009*.
- DESCHAMPS J.C., OTT R.S., MCKENTEE K., HEATH H., HEINRICHS R.R., SHANKS R.D., HIXON J.E. Effects of zearanol on reproduction in beef bulls : scrotal circumference, serving ability, semen characteristics and pathologic changes of the reproductive organs. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 137-147.
- DEUTSCHER G.H., ZERFOSS L.L., CLANTON D.C. Time of zearanol implantation on growth, reproduction and calving of beef heifers. *J. Anim. Sci.*, 1986, **62**, 875-886.
- DIEKMAN M.A., GREEN M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.*, 1992, **70**, 1615-1627.
- DIEL P., GEIS R.B., CALDARELLI A., SCHMIDT S., LECHOWSKY U. L., VOSS A., DODGE J.A. Natural and anthropogenic environmental oestrogens : the scientific basis for risk assessment. Structure/activity relationships. *Pure Appl. Chem.*, 1998, **70**, 1725-1733. DRION P.V., BECKERS J.F., DERIVAUX J., ECTORS F. Physiologie de la reproduction animale. Université de Liège : Liège, 2002, 645 p.
- GALTIER P. Biological fate of mycotoxins in animals. *Rev. Méd. Vét.*, 1998, **149**, 549-554.
- GAUMY J.L., BAILLY J.D., BURGAT V., GUERRE P. Zéaralénone : propriétés et toxicité expérimentale. *Rev. Méd. Vét.*, 2001, **152**, 219-234.
- GUERRE P., BAILLY J.D., BENARD G., BURGAT V. Excrétion lactée des mycotoxins : quels risques pour le consommateur ? *Rev. Méd. Vét.*, 2000, **151**, 7-22.
- GUTENDORF B., WESTENDORF J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogènes and xenoestrogens. *Toxicology*, 2001, **166**, 79-89.
- HEAD K.A. Isoflavones and other soy constituents in Human Health and disease. *Alt. Med. Rev.*, 1997, **2**, 433-450.
- IKEDA K., ARAO Y., OTSUKA H., KIKUCHI A., KAYAMA F. Estrogen and phytoestrogen regulate the mRNA expression of adrenomedullin and adrenomedullin receptor component in the rat uterus. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, **203**, 27-34.
- KENNEDY D.G., HEWITT S.A., MCDEVOY J.D.G., CANNAVAN A., BLANCHFLOWER J., ELIOTT C.T. Zearanol is formed from Fusarium spp. toxins in cattle. *Food Add. Cont.*, 1998, **15**, 393-400.

- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Independent zearalenone evaluation-2000. [en ligne] (07/05/2005) Adresse URL : <http://www.codex-alimentarius.net/web/jefca.jsp> Consulté le 07/05/2005.
- KALLELA K. The estrogenic effect of silage fodders. *Nord. Vet. Med.*, 1980, **32**, 480-486.
- KALLELA K., HEINONEN K., SALONIEMI H. Plant oestrogens : the cause of decreased fertility in cows. *Nord. Vet. Med.*, 1984, **36**, 124-129.
- KENNEDY D.G., HEWITT S.A., MCEVOY J.D.G., CANNAN A., BLANCHFLOWER J., ELIOTT C.T. Zeranone is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle. *Food Addit. Contam.*, 1998, **15**, 393-400.
- KLEINSMITH L.J., KERRIGAN D., KELLY J., MOLLEN B. Understanding estrogens receptors, tamoxifen and raloxifen. [en ligne] (01/08/05) Adresse URL : <http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer> Consulté le 06/12/05.
- KRSKA R., PETERSSON H., JOSEPHS RD, LEMMENS M, MAC DONALD S, WELZIG E. Zearalenone in maize : stability testing and matrix characterisation of a certified reference material. *Food Addit. Contam.*, 2003, **20**, 1141-1152.
- LAPIK O., TURSA J., KLEINOVA T., VITKOVA M., DVOAKOVA H., KLEDJUS B., MORAVCOVA J. Synthesis of hapten and conjugates of coumestrol and development in immunoassay. *Steroids*, 2003, **68**, 1147-1155.
- LAUNEAY F.M., YOUNG P.B., STERKS S.S., BLOKLAND M.H., KENNEDY D.G. Confirmatory assay for zearanol, taleranol and the *Fusarium* spp. toxins in bovine urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 2004, **21**, 52-62.
- LIU M., RAM B., HART L., PESTKA J. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **50**, 332-336.
- LUNDH T.J., PETERSSON H., KIESSLING K.H. Liquid chromatographic determination of the estrogens daidzein, formononetin, coumestrol, and equol in bovine blood plasma and urine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, **71**, 938-941.
- LUNDH T.J. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, **208**, 33-39.
- MALEKINEJAD H., MAASBAKKERR., FINK-GREMMELS J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet. J.*, 2005, in press.
- MAZUR W., ADLERCREUTZ H. Naturally occurring oestrogens in food. *Pure Appl. Chem.*, 1998, **70**, 1759-1776.
- MILLS C. O., ERASMUSON A.F., WILKINS A.L., TOWERS N.R., SMITH B.L., GARTHWAITE I., SCAHILL B;G, HANSEN R.P. Ovine metabolism of zearalenone to alpha-zearalanol. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, **44**, 3241-3250.
- MIROCHA C.J., SCHAUERHAMER B., PATHRE S.V. Isolation, detection, and quantification of zearalenone in maize and barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1974, **57**, 1104-1110.
- NELSON C. E. Strategies of mold control in dairy feeds. *J. Dairy Sci.*, 1993, **76**, 898-902.
- NOUT M.J.R., BOUWMEESTER H.M., HAAKSAMA J. VAN DIJK H. Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *J. Agri. Sci.*, 1993, **121**, 323-326.
- OLSEN M., PETERSSON H., SANDHOLM K., KIESSLING K. Quantitative liquid chromatographic method using fluorescence detection for determining zearalenone and its metabolites in blood plasma and urine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1985, **68**, 632-635.
- ORGANISATION MONDIALE DU COMMERCE L'affaire hormones. [en ligne] (sans date) Adresse URL : http://www.wto.org/french/tratop_f/sps_f/sps_agreement_cbt_f/c5s3p2_f.html Consulté le 11/01/2006.
- PALLARONI L., VON HOLST C., ESKILSSON S., BJORKLUND E. Microwave-assisted extraction of zearalenone from wheat and corn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 161-166.
- PALLARONI L., VON HOLST C. Comparison of alternative and conventional extraction techniques for the determination of zearalenone in corn. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 908-912.
- PARLEMENT EUROPÉEN, CONSEIL EUROPÉEN Directive 2002/32/CE du Parlement européen et du Conseil du 7 mai 2002 sur les substances indésirables dans les aliments pour animaux. *Journal officiel n° L 140 du 30/05/2002*, 10-22.
- PETERSSON H., KIESSLING KH. Liquid chromatography determination of the plant estrogens coumestrol and isoflavones in animal feed. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 1984, **67**, 503-506.
- PLACINTA C.M., D'MELLO J.P.F., MACDONALD A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 1999, **78**, 21-37.
- PRELUSKY DB, SCOTT PM, TRENHOLM HL, LAWRENCE GA. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J. Environ. Sci. Health B*, 1990, **25**, 87-103.
- RICHARD J.L., BENETT G.A., ROSS P.F., NELSON P.E. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. *J. Anim. Sci.*, 1993, **71**, 2563-2575.
- ROSENBERG Z. Flavonoids can block PSA production by breast and prostate cancer cell lines. *Clin. Chim. Acta*, 2002, **317**, 17-26.
- SALONIEMI H., WAHALA K., NUKANEN-KURKI P., KALLELAL K., SAASTAMOINEN I. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, **208**, 13-17.

- SCHWADORF K., MULLER H.M. Determination of alpha- and beta-zearalenol and zearalenone in cereals by gas chromatography with ion-trap detection. *J.Chromatogr.*, 1992, **20**, 259-267.
- SCIPPO M.-L., VAN DE WEERDT C., WILLEMSEMP, FRANÇOIS J.M., RENTIER-DELRUE F., MULLER M., MARTIAL J.A., MAGHUIN-ROGISTER G. Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays. *Anal. Chim. Acta*, 2002, **473**, 135-141.
- SCIPPO M.-L., VAN DE WEERDT C., WILLEMSEMP, FRANÇOIS J.M., RENTIER-DELRUE F., MULLER M., MARTIAL J.A., MAGHUIN-ROGISTER G. Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **8**, 664-669.
- SCOTT P.M. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Rev. Méd. Vét.*, 1998, **149**, 543-548.
- SCUDAMORE K., PATEL S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Add. Contam.*, 2000, **17**, 407-416.
- SEGUIN P., SIVESIN E., ZHENG W. Facteurs affectant la concentration de phytoestrogènes dans les légumineuses fourragères. [en ligne] (sans date) Adresse URL : www.agrireseau.qc.ca/grandescultures/documents/2003-no3.pdf. html Consulté le 08/07/2005.
- SHARPE R.M. Environmental oestrogens and male infertility. *Pure Appl. Chem.*, 1998, **70**, 1685-1701.
- SHREEVE B., PATTERSON D., ROBERTS B. The 'carry-over' of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1979, **17**, 151-152.
- SMITH B.L., TOWERS N.R. Mycotoxicoses of grazing animals in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, 2002, **50**, 28-34.
- SMITH J., DI MENNA M., MCGOWAN L. Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *J. Reprod. Fertil.*, 1990, **89**, 99-106.
- SMITH T.K. Les mycotoxines de fusarium posent un grave problème en élevage porcin. *Feed. Times*, 2002, **7**, 24-25.
- STAIGMILLER R.B., BELLOWS R.A., SHORT R.E. Growth and reproductive traits in beef heifers implanted with zeranol. *J. Anim. Sci.*, 1983, **57**, 527-534.
- STAIGMILLER R.B., BROWNSON R.M., KARTCHNER R.J., WILLIAMS J. H. Sexual development in beef bulls following zeranol implants. *J. Anim. Sci.*, 1985, **60**, 342-351.
- TANAKA T., YAMAMOTO S., HASEGAWA A., AOKI N., BESLING J.R., SUGIURA Y., UENO Y. A survey of the natural occurrence of fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivaleenol and zearalenone, in cereals harvested in the Netherlands. *Mycopathologia*, 1990, **110**, 19-22.
- THOUVENOT D., MORFIN R.F. Radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum : production, properties and use of porcine antibodies. *Appl. Env. Microbiol.*, 1982, **45**, 16-23.
- VINCELLI P. Fumonisin, Vomitoxin, and Other Mycotoxins in Corn Produced by Fusarium Fungi. [en ligne] (sans date) Adresse URL : <http://www.ca.uky.edu/agc/pubs/id/id121/id121.html> Consulté le 17/03/05.
- VISCONTI A., PASCALE M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 1998, **31**, 133-140.
- WEAVER G.A., KURTZ H.J., BEHRENS J.C., ROBINSON T.S. Effect of zearalenone on dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 1826-1828.
- WILLEMSEN P., SCIPPO M.-L., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Use of specific bioluminescent cell lines for the detection of steroid hormone (ant)agonists in meat producing animals. *Anal. Chem. Acta*, 2002, **473**, 119-126.
- WILLEMSEN P., SCIPPO M.-L., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 655-653.
- YIANNIKOURIS A., JOUANNY J.P. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *Prod. Anim.*, 2002, **15**, 3-16.
- ZDUNCZYK S., ZERBE H., HOEDEMAEKER M. Importance of estrogens and estrogen-active compounds for udder health in cattle : a review. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2003, **110**, 461-465.