

Etude de l'innocuité sur progéniteurs hématopoïétiques de fractions de blé traité par le procédé Oxygreen®

*Absence of toxicological effects of milled fractions extracted
from DON-contaminated wheat grain on hematopoietic
progenitor cells*

Sibiril, Yann (1) ; Dubois, Michel (2) ; Parent-Massin, Dominique (1)

*(1) - Laboratoire de Toxicologie Alimentaire EA 3880, UFR Sciences /
Université de Bretagne Occidentale, 6 avenue Le Gorgeu CS93837 –
29238 Brest Cedex 3*

*(2) - Green Technologies - GOEMAR, ZAC La Madeleine, avenue
Général Patton CS 61848 – 35418 Saint-Malo Cedex*

Mèl : parentm@univ-brest.fr

Résumé

L'effet toxique majeur des trichothécènes est leur myélotoxicité. Cet effet peut être détecté à l'aide d'un bioessai, réalisé à partir de tests clonogéniques sur progéniteurs granulo-monocytaires humains. Le but de cette étude est de détecter via ce bioessai la présence de molécules myélotoxiques dans des fractions de blé contaminées par des trichothécènes préalablement traitées avec le procédé Oxygreen®. Des études antérieures ont permis d'identifier les concentrations cytotoxiques de T-2, HT2, DON, DAS *in vitro* sur progéniteurs granulo-monocytaires humains. Les données d'analyses réalisées sur des fractions testées sur le bioessai ont montré la diminution, voire l'élimination de la contamination par les trichothécènes. Cependant, on peut craindre que Oxygreen® induise la formation de produits néoformés potentiellement myélotoxiques. L'hypothèse de la formation de produits néoformés myélotoxiques a été évaluée en comparant la myélotoxicité *in vitro* sur progéniteurs hématopoïétiques humains d'extraits de blé fortement contaminés par DON traités ou non pas Oxygreen®.

Les résultats obtenus montrent que Oxygreen® élimine la présence de mycotoxines myélotoxiques des fractions du grain de blé et n'entraîne pas l'apparition de produits néoformés myélotoxiques.

Mots clés : Oxygreen®, ozone, décontamination, bioessai, CFU-GM, trichothécènes, deoxynivalenol

Abstract

Major adverse effect of trichothecenes is hematotoxic due to a strong myelotoxicity of these toxins on hematopoietic progenitors. This effect can be detected according to a bioassay using clonogenic assays with human hematopoietic progenitors. The aim of this study is to detect via this test the presence of myelotoxic molecules in wheat fractions contaminated by DON, treated or not par a new decontamination process Oxygreen®.

Analysis data showed that trichothecene have been eliminated by treatment with Oxygreen®, however this hypothesis of the formation of by-products myelotoxic induced by treatment had to be tested on hematopoietic progenitors cultivated in the presence of wheat extract contaminated by DON and treated or not by Oxygreen®.

Results show that Oxygreen® treatment eliminates myelotoxic mycotoxins from wheat fractions and does not induce the formation of myelotoxic by-products.

Keywords: Oxygreen®, ozone, décontamination, bioassay, CFU-GM, trichothecenes, deoxynivalenol

Introduction

Les trichothécènes sont des mycotoxines produites par de nombreux champignons tels que *Fusarium*, *Myrothecium* ou *Stachybotrys* retrouvés dans les aliments consommés par l'Homme ou les animaux (Moreau, 1974; Moss, 1996). Les trichothécènes appartiennent au groupe des sesquiterpénoïdes qui possèdent un squelette tricyclique formé par un cyclopentane, un cyclohexane et un cycle à six chaînons oxygénés (Vidal *et al.* 1985). Le deoxynivalenol (DON), trichothécène du groupe B (Ueno and Ueno, 1978), est le trichothécène le plus répandu sur le plan mondial, il est produit par un champignon du genre *Fusarium* qui se développe sur les céréales et les plantes légumineuses (Ueno, 1983). Aussi bien les Hommes que les animaux souffrent de pathologies sévères après consommation d'aliments contaminés par les trichothécènes (Joffe, 1974, 1978; Moreau, 1974, Szathimary, 1983; Sato *et al.*, 1978; Yoshizama, 1983). Ces mycotoxicoses ont comme symptômes communs des troubles hématologiques sévères se manifestant principalement par des thrombocytopénies (diminution du nombre de plaquettes) et des leucopénies (diminution du nombre de globules blancs). Les patients présentent rapidement des troubles de la coagulation et voient leur résistance aux infections diminuer. En conséquence ils sont victimes d'hémorragies massives et de septicémies (Hsu *et al.*, 1972; Yoshizawa, 1983; Cosgriff *et al.*, 1984; Rousseaux *et al.*, 1984). Il a été démontré que les troubles hématologiques sont dus à une inhibition de la formation des cellules sanguines dit

"effet myélotoxique" induite par les trichothécènes. *In vitro*, les trichothécènes ont un puissant effet cytotoxique puisqu'elles agissent à très faibles doses sur les progéniteurs hématopoïétiques humains (Parent-Massin *et al.*, 1994; Parent-Massin et Thouvenot, 1995, Rio *et al.*, 1997; Froquet *et al.*, 2001; Parent-massin, 2004). Les trichothécènes ont également été décrits comme étant des agents immunotoxiques c'est-à-dire qu'il a été observé qu'après intoxication, les défenses immunitaires contre les micro-organismes sont diminuées (Petska, 1996; Petska *et al.*, 2004; Hymery *et al.*, 2006 a et b, 2007).

Le procédé Oxygreen® est un nouveau traitement du blé par ozone produit en continu *in situ*. Il permet, par un contact homogène et contrôlé entre l'ozone et le grain de blé, d'améliorer les propriétés technologiques des farines pour différents usages spécifiques et de modifier les caractéristiques techniques des produits fabriqués à partir de ces farines, de diminuer la charge microbienne des farines, d'éliminer les insectes, les résidus de produits phytosanitaires, et les mycotoxines. Le procédé Oxygreen® prend place dans la procédure classique de meunerie entre le nettoyage des grains et la mouture en elle même. Gaou *et al.* (2005) et Dubois *et al.* (2006) ont démontré que le traitement du blé par le procédé Oxygreen® n'entraînait pas d'effet indésirable chez le rat par une étude de toxicité orale 28 jours et qu'il y avait équivalence en substance entre les grains traités à l'ozone et les grains non traités. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) en 2004 a autorisé l'utilisation du procédé Oxygreen® en tant que traitement d'amélioration de la qualité des farines.

De nombreux traitements chimiques, physiques et biologiques ont été testés dans le but d'éliminer ou de réduire la contamination en mycotoxines des aliments (Charmley et Prelusky, 1994; Karlovsky, 1999; Trigo-Stockli, 2002; Anon, 2003). L'ozone gazeux a démontré son pouvoir détoxifiant sur des mycotoxines n'appartenant pas à la famille des trichothécènes (aflatoxine B1, B2, G1 et G2, fumonisine B1, ochratoxine A, patuline, zearalenone) en réduisant leur activité biologique testée sur des bioessais (McKenzie *et al.*, 1997; Lemke *et al.*, 1999). Des essais de traitements à l'ozone de céréales contaminées par DON ont été menés (Young *et al.*, 1986; 2006). Tout d'abord sous forme gazeuse sur du maïs, de bons résultats ont été obtenus par addition de bisulfite de sodium, ensuite sous forme aqueuse sur du blé. Il est apparu que la destruction du DON était dépendante du pH. A pH 4-6, DON est aisément dégradé, à pH 7-8, la dégradation des mycotoxines dépend de l'état d'oxydation du carbone en C8 et à un pH supérieur à 9 la destruction des mycotoxines est faible à nulle.

Le but de cette étude est de détecter à l'aide d'un bioessai la présence de molécules myélotoxiques dans des fractions de blé contaminé par des trichothécènes et traité ou non par le procédé Oxygreen®. Ce bioessai est réalisé à partir de tests clonogéniques sur progéniteurs hématopoïétiques humains. Des études antérieures (Parent-Massin *et al.*, 1994; Parent-Massin et Thouvenot, 1995, Rio *et al.*, 1997; Froquet *et al.*, 2001; Parent-Massin, 2004) ont démontré la grande sensibilité de ce modèle cellulaire aux trichothécènes. De plus, l'utilisation de ce bioessai permet de vérifier que le procédé Oxygreen® n'induit pas l'apparition de produits néoformés myélotoxiques.

Matériel et méthodes

1. Préparation des extraits

Deux lots de blé naturellement contaminés en DON, contamination de 800 ppb pour le lot 1 et 2800 ppb pour le lot 2 ont été utilisés. Le lot 1 est divisé en 2 sous-lots ; le premier n'a subi aucun traitement de décontamination et servira de référence et le second a bénéficié d'un traitement par Oxygreen®, dit Oxygreen 1. Le lot 2 est divisé en 3 sous-lots le premier n'a subi aucun traitement de décontamination et servira de référence pour le lot 2, le second a subi un traitement par Oxygreen® dit Oxygreen 1 et la troisième un traitement par Oxygreen® dit Oxygreen 2. Le détail des traitements Oxygreen 1 et Oxygreen 2 ne sont pas présentés ici. Le traitement Oxygreen 2 est considéré comme plus fort que le traitement 1 (dose d'ozone supérieure).

Un gradient de farines est ensuite réalisé sur chaque sous-lot (Tableau 1). Ce gradient est réalisé grâce à un moulin pilote homologue d'un moulin industriel. (Moulin de l'ENSMIC).

Tableau 1 : Traitement des différentes fractions et numérotation des extraits correspondants

	Blé contaminé en DON (800 ppb)		Blé contaminé en DON (2800 ppb)		
	Non traité	Oxygreen 1	Non traité	Oxygreen 1	Oxygreen 2
Farine 1 (F1) (centre grain, type 45)	1	5	9	14	19
Farine 2 (F2) (centre élargi, type 55)	2	6	10	15	20
Farine 3 (F3) (farine blanche riche en sels minéraux, type 65)	-	-	11	16	21
Remoulages (R)	3	7	12	17	22
Sons (S)	4	8	13	18	23

L'extraction et le dosage de DON ont été réalisés pour les différentes fractions par un laboratoire accrédité (Qualtech). Les extraits ont été préparés de manière identique pour les différentes parties (Non traités, Oxygreen 1, Oxygreen 2) de manière à avoir une concentration finale en DON proche de 12 µg/mL pour les extraits issus de fractions non traitée. Les extraits secs ont été repris dans 1 mL de méthanol 100 % (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentration en DON dans les différentes fractions et dilutions des extraits

	Blé lot 1 800 ppb DON	Contamination en DON des fractions de blé (µg/kg)	Concentration en DON dans l'extrait (M)	Facteur de dilution	Concentration en DON dans les cultures cellules (M)
F1	1	630	$1,66.10^{-4}$	33,2	10.10^{-8}
	5	610	$1,54.10^{-4}$	33,2	$9,30.10^{-8}$
F2	2	760	$1,92.10^{-4}$	38,5	10.10^{-8}
	6	670	$1,70.10^{-4}$	38,5	$8,82.10^{-8}$
R	3	2960	$7,99.10^{-5}$	16	10.10^{-8}
	7	1270	$3,43.10^{-5}$	16	$4,29.10^{-8}$
S	4	2640	$8,24.10^{-5}$	16,5	10.10^{-8}
	8	890	$6,01.10^{-5}$	16,5	$7,29.10^{-8}$
	Blé lot 2 2800 ppb DON	Contamination en DON des fractions de blé (µg/kg)	Concentration en DON dans l'extrait (M)	Facteur de dilution	Concentration en DON dans les cultures cellules (M)
F1	9	1560	$1,16.10^{-4}$	23,2	10.10^{-8}
	14	1390	$1,03.10^{-4}$	23,2	$8,91.10^{-8}$
	19	1070	$7,94.10^{-5}$	23,2	$6,86.10^{-8}$
F2	10	1520	$1,05.10^{-4}$	21	10.10^{-8}
	15	1390	$9,62.10^{-5}$	21	$9,14.10^{-8}$
	20	1080	$7,47.10^{-5}$	21	$7,11.10^{-8}$
F3	11	1580	$1,01.10^{-4}$	20,3	10.10^{-8}
	16	1590	$1,02.10^{-4}$	20,3	$10,1.10^{-8}$
	21	1200	$7,69.10^{-5}$	20,3	$7,59.10^{-8}$
R	12	6890	$6,39.10^{-4}$	12,8	10.10^{-8}
	17	2880	$2,67.10^{-5}$	12,8	$4,18.10^{-8}$
	22	2260	$2,10.10^{-5}$	12,8	$3,28.10^{-8}$
S	13	8930	$8,29.10^{-5}$	16,6	10.10^{-8}
	18	1990	$1,85.10^{-5}$	16,6	$2,23.10^{-8}$
	23	1510	$1,40.10^{-5}$	16,6	$1,69.10^{-8}$

2. Culture cellulaire

Les cultures de progéniteurs hématopoïétiques (CFU-GM) ont été réalisées à partir de cellules mononucléées de sang de cordon ombilical humain selon le protocole défini par l'ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods) et décrits par Pessina et al (2003). Les cultures sont mises à incuber à 37°C, sous 5% de CO₂ et 100% d'humidité pendant 14 jours.

Chaque extrait (de 1 à 23) a été ajouté à la culture cellulaire à raison de 2% du volume final au début de la culture. Chaque extrait a été testé à 3 reprises en triplicat.

Les résultats sont exprimés en valeur absolue de colonies (une colonie est un agrégat d'au moins 50 cellules) et en pourcentage de prolifération. Pour chaque expérience la moyenne de chaque triplicat puis le rapport "extrait/témoin solvant" est réalisé. 100 % de prolifération correspondant au témoin solvant. L'innocuité du solvant a été vérifiée en comparant le témoin solvant au témoin milieu de culture.

Il a été appliqué aux extraits provenant de fractions non traitées un facteur de dilution tel que la concentration finale dans les cultures ne soit pas cytotoxique. Les fractions équivalentes traitées par Oxygreen 1 ou 2 ont bénéficié du même facteur de dilution (Tableau 2).

Résultats et discussion

Dans le grain contaminé par DON un gradient de concentration est observé : les extraits réalisés à partir des couches externes sont plus fortement contaminés en DON que les extraits réalisés à partir des couches internes du grain. Pour le blé contaminé à 800 ppb la concentration en DON est égale à 2640 µg/kg dans les sons et 630 µg/kg dans la farine F1. Pour le blé contaminé à 2800 ppb, la concentration en DON est égale à 8930 µg/kg dans les sons et 1560 µg/kg dans la farine F1 (Tableau 2).

Les résultats du bioessai sont présentés dans le tableau 3 et la figure 1.

En présence des extraits obtenus à partir de blé non traité du lot 1, contaminé à 800 ppb, la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques est d'environ 50% comparée au témoin. Après traitement par le procédé Oxygreen®, la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques augmente de manière statistiquement significative pour toutes les fractions, l'efficacité de clonage passant de : 1 à 1,70 pour la farine F1 ; 1,76 pour la farine F2 ; 1,68 pour les remoulages et 1,72 pour les sons ; mettant ainsi en évidence une diminution de la toxicité des extraits similaire pour toutes les fractions.

Pour le lot 2, contaminé à 2800 ppb, la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques exposés aux fractions obtenues à partir du sous-lot non traité est comprise entre 43 et 50 % par rapport au témoin. Après traitement Oxygreen 1, l'augmentation de prolifération n'est pas statistiquement significative pour la farine F3. L'efficacité de clonage augmente de 1 à 1,40 pour la farine F1, 1,33 pour la farine F2, 1,17 pour la farine F3, 1,84 pour les remoulages et 1,53 pour les sons. Le traitement Oxygreen 1 semble donner de meilleurs résultats sur les fractions les plus externes des grains fortement contaminés.

Tableau 3 : Comparaison de la myélotoxicité des extraits de blé sur les progéniteurs hématopoïétiques humains. Les résultats sont exprimés en nombre absolu de colonies issues d'un progéniteur hématopoïétique après 14 jours de culture.

<i>Blé 1 : 800 ppb DON</i>	<i>Témoin</i>	<i>Oxygreen 1</i>	
F1	52 ± 6	87 ± 9***	
F2	52 ± 3	91 ± 9***	
R	51 ± 1	85 ± 3***	
S	50 ± 4	86 ± 9***	
<i>Blé 2 : 2800 ppb DON</i>		<i>Oxygreen 1</i>	<i>Oxygreen 2</i>
F1	49 ± 8	67 ± 1*	89 ± 11***
F2	50 ± 9	66 ± 1*	85 ± 9***
F3	50 ± 5	59 ± 11	83 ± 16***
R	43 ± 7	78 ± 11*	86 ± 9***
S	48 ± 2	74 ± 9**	98 ± 5***

*, **, *** : différence statistiquement significative à $P < 0,1$, $P < 0,05$, $P < 0,01$ respectivement comparée au témoin solvant

Après le traitement Oxygreen 2, la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques humains augmente de manière statistiquement significative quelque soit la fraction considérée. L'efficacité de clonage augmente de 1 à 1,82 pour la farine F1, 1,71 pour la farine F2, 1,66 pour la farine F3, 2,03 pour les remoulages et 2,05 pour les sons.

Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent d'une part d'évaluer l'effet d'Oxygreen® sur la décontamination des grains de blé contaminés par DON à un faible (800 ppb) et à un fort niveau (2800 ppb), d'autre part de déterminer si les extraits de blé traités avec Oxygreen® présentent un effet myélotoxique qui aurait pu être attribué à la présence d'un produit néoformé à partir de DON après traitement Oxygreen®.

Les résultats analytiques ont confirmé l'élimination par Oxygreen® de DON sur et dans les grains de blé. Les résultats du bioessai sur progéniteurs hématopoïétiques ont permis d'exclure l'hypothèse de la présence, dans les extraits, d'un éventuel produit néoformé lors du traitement Oxygreen®, qui serait autant ou plus myélotoxique que DON. En effet, il n'a pas été observé d'inhibition supérieure de la prolifération des progéniteurs granulomonocytaires après traitement par Oxygreen®, particulièrement par les extraits peu contaminés, extraits pour lequel cet effet aurait été détecté rapidement.

Prolifération des CFU-GM humains exposés aux extraits de blé traités Oxygreen

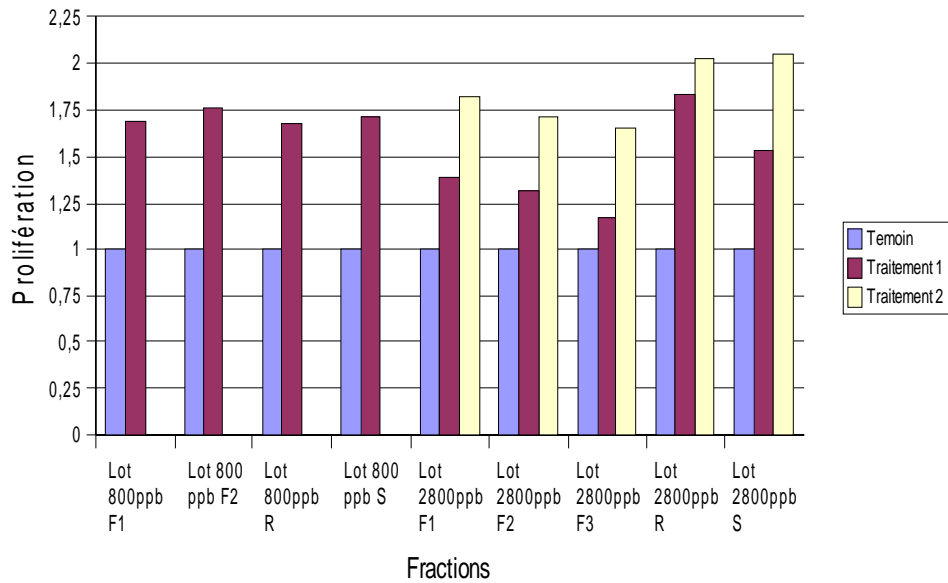


Figure 1 : Comparaison de l'efficacité de clonage après exposition aux fractions non traitées et traitées par Oxygreen®
 Pour tous les binômes (Blé 1) ou trinômes (Blé 2), la fraction Témoin est affectée de la valeur 1.
 Témoin : extrait non traité Oxygreen, Traitement 1 : Oxygreen 1, Traitement 2 : Oxygreen 2.

Ces résultats complètent ceux obtenus dans l'étude de toxicité 28 jours (Gaou et al, 2005), confirmant l'innocuité du procédé Oxygreen®.

Références

- Anon, 2003. Mycotoxins :Risks in plant, animal and human systems. Task Force Report No 139, Ames, Council for Agricultural Science and Technology 216p.
- Charmley LL, Prelusky DB, 1994. Decontamination of *Fusarium* mycotoxins, in Miller JD, Trenholm HL, *Mycotoxins in grain : Compounds Other Than Aflatoxin*. St. Paul Minn., Eagan Press, 421-435.
- Cosgriff TM, Bunner DP, Wannemacher RW, Hodgson LA, 1984. The hemostatic derangement produced by T-2 toxin in guinea pigs, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 76, 454-463.
- Dubois M, Coste C, Despres AG, Efstathiou T, Nio C, Dumont E, Parent-Massin D, 2006. Safety of Oxygreen®, an ozone treatment on wheat grains. Part 2. Is there a substantial equivalence between Oxygreen-treated wheat grains and untreated wheat grains?, *Food Additives and Contaminants*, 23, 1-15.

- Froquet R, Sibiril Y, Parent-Massin D, 2001. In vitro toxicity of trichothecenes on human platelet precursors (CFU-MK), *Human and Experimental Toxicology*, 20, 84-89.
- Gaou I, Dubois M, Pfohl-Leszkowicz A, Coste C, De Jouffrey S, Parent-Massin D, 2005. Safety of Oxygreen®, an ozone treatment on wheat grains. Part 1. A four-week toxicity study in rats by dietary administration of treated wheat, *Food Additives and Contaminants*, 22, 1113-1119.
- Hsu IC, Smalley EB, Strong FM, Ribelin WE, 1972. Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with lethal toxicosis in dairy cattle, *Journal of Applied Microbiology*, 24, 684-690.
- Hymery N, Sibiril Y, Parent-Massin D, 2006a, Improvement of human dendritic cell culture for immunotoxicological investigations, *Cell Biology and Toxicology*, 22, 243-255.
- Hymery N, Sibiril Y, Parent-Massin D, 2006b, In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells, *Toxicology in Vitro*, 20, 899-909.
- Hymery N, Sibiril Y, Parent-Massin D, 2007, Dangers immunotoxiques et hématotoxiques chez l'homme. Actes du colloque RARE-Fusariotoxines 2009. Arcachon, 11-13 septembre 2007, www.SYMPOscience.org
- Joffe AZ, 1974. Toxicity of *Fusarium poae* and *F. sporotrichoides* and its relation to alimentary toxic aleukia, in Purchase IFH, *Mycotoxins*. Amsterdam, Elsevier, p. 229-262.
- Joffe AZ, 1978. *Fusarium poae* and *F. sporotrichoides* as a principal causal agent of alimentary toxic aleukia, in Wyllie TD, Morehouse LG, *Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook. Mycotoxicoses of Man and Plants : Mycotoxin Control and Regulatory Aspects, vol 3*. New York, Marcel Dekker Inc, p. 21-86.
- Karlovsky P, 1999. Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed and food production, *Natural Toxins*, 7, 1-23.
- Lemke SL, Maura K, Ottinger SE, McKenzie KS, Wang N, Fickey C, Kubena LF, Phillips TD, 1999. Assessment of the estrogenic effects of zearalenone after treatment with ozone utilizing the mouse uterine weight bioassay, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 56, 283-295.
- McKenzie KS, Sarr AB, Mayura K, Bailey RH, Miller DR, Rogers TD, Norred WP, Voss KA, Plattner RD, Kubena LF, Phillips TD, 1997. Oxydative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food Chemical and Toxicology*, 35, 807-820.
- Moreau C, 1974. *Moisissures toxiques dans l'alimentation*. Paris, Masson, p. 279-286.
- Moss MO, 1996. Mycotoxic fungi, in Eley AR, *Microbial Food Poisoning*, 2nd ed. New York, Chapman and Hall, p. 75-93.
- Parent-Massin D, Fuselier R, Thouvenot D, 1994. In vitro toxicity of trichothecenes on human hematopoietic progenitors, *Food Additives Contaminants*, 11, 441-447.
- Parent-Massin D, Thouvenot D, 1995. In vitro toxicity of trichothecenes on rat hematopoietic progenitors, *Food Additives Contaminants*, 12, 41-49.
- Parent-Massin D, 2004. Haematotoxicity of trichothecenes, *Toxicology Letters*, 153, 75-81.
- Petska J, 1996. Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin), *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48, 1-34.

- Petska J, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ, 2004. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes : unraveling a paradox, *Toxicology Letters*, 153, 61-73.
- Pessina A, Albella B, Bayo M, Bueren J, Brantom P, Casati S, Croera C, Parchment R, Parent-Massin D, Schoeters G, Sibiril Y, Van Den Heuvel R, Gribaldo L. 2003 Application of the CFU-GM Assay to predict Acute Drug-Induced Neutropenia: An international Blind Trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. *Toxicological Sciences*, **75**, 355-367.
- Rio B, Lautraite S, Parent-Massin D, 1997. *In vitro* toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors, *Human and Experimental Toxicology*, 16, 673-679.
- Rousseaux CG, Nicholson S, Schiefer HB, 1984. Fatal placenta hemorrhage in pregnant CD-1 mice following one oral dose of T-2 toxin, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 49, 95-98.
- Sato N, Ito T, Kumada H, Ueno Y, Asano K, Saito M, Ohtsubo K, Ueno T, Hatanaka Y, 1978. Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria XIII. Hematological changes in mice by a single and repeated administrations of trichothecenes, *Journal of Toxicological Sciences*, 3, 335-356.
- Szathimary C, 1983. Toxicoses. Natural occurrence and control. Redmold diseases and natural occurrence in Japan, in Ueno Y, *Development in Food Science. Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Tokyo, Elsevier, p. 229-250.
- Trigo-Stockli DM, 2002. Effect of processing deoxynivalenol and other trichothecenes, in DeVries JW, Trucksess MW, Jackson LS, *Mycotoxins and Food Safety : proceedings of an American Chemical Society Symposium held in Washington, DC, USA, on 21-23 August 2000*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 181-188.
- Ueno Y, Ueno I, 1978. Toxicology and biochemistry of mycotoxins, in Uraguchi K, Yamakazi M, *Toxicology, Biochemistry and Pathology of Mycotoxins*. New York, J. Wiley and son, p. 107-188.
- Ueno Y, 1983. General Toxicology, in Ueno Y, *Developments in food science. Trichothecenes. Chemical, biological and toxicological aspects*. Tokyo, Elsevier, p. 135-146.
- Vidal D, Chirpaz-Cerbat D, Creach O, Fontanges R, 1985. Les mycotoxines du groupe trichothécènes, *Lyon pharmaceutique*, 36, 63-76.
- Yoshizama T, 1983. Toxicoses. Natural occurrence and control. Redmold diseases and natural occurrence in Japan, in Ueno Y, *Development in Food Science. Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Tokyo, Elsevier, p. 195-209.
- Young JC, 1986. Reduction in Levels of Deoxynivalenol in Contaminated Corn by Chemical and Physical Treatment, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 34, 465-467.
- Young JC, Zhu H, Zhou T, 2006. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone, *Food and Chemical Toxicology*, 44, 417-424.