

# BIO-ACCUMULATION DE LA FUMONISINE B1 CHEZ LE POULET ET EFFET D'ARGILE INTERCALEE PAR DES ALGUES SUR CETTE ACCUMULATION

J. Laurain<sup>1</sup>, D. Tardieu<sup>2</sup>, M. Matard-Mann<sup>1</sup>, M. Angeles Rodriguez<sup>1</sup>, Rim Boulmane<sup>1</sup> et P. Guerre<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Olmix S.A., ZA du Haut du Bois, 56580 Bréhan, France,

<sup>2</sup>ENVT, Université de Toulouse, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France  
[philippe.guerre@envt.fr](mailto:philippe.guerre@envt.fr)

## RÉSUMÉ

Les fumonisines sont des mycotoxines de répartition mondiale pour lesquelles des teneurs maximales sont recommandés dans l'alimentation animale. Chez la volaille, la toxicité de ces composés se manifeste aux faibles doses par une atteinte hépatique et des chutes de performances. La toxicocinétique des fumonisines se caractérise par une faible absorption orale et une élimination plasmatique rapide. Pour ces raisons, on considère que les fumonisines ne s'accumulent pas chez les animaux, y compris les volailles. Cependant, des études récentes sur le poulet et la dinde ont montré que, chez ces espèces, le temps de demi-élimination hépatique de la fumonisine B1 (FB1) était de plusieurs jours, ce qui suggère que la FB1 peut s'accumuler dans l'organisme. Les objectifs de cette étude sont de valider cette hypothèse et de mesurer l'effet d'un adsorbant à base d'argile intercalée grâce à des extraits d'algues (brevet EP2674397) appelée algoclay technology (AC) sur cette accumulation. Des poulets âgés de 21 jours ont reçu une dose considérée comme non toxique d'environ 20mg de FB1+FB2/kg d'aliments. Les mesures effectuées après 4 et 9 jours d'exposition ont révélé une augmentation des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) dans le foie, sphingolipides utilisés comme biomarqueurs d'exposition aux fumonisines, sans signe de toxicité ni altération de performances. Le dosage de la FB1 a été réalisé par UHPLC-MS/MS dans le foie et les muscles après purification des échantillons sur colonne d'immuno-affinité. La FB1 s'est accumulée dans le foie des poulets exposés durant 4 à 9 jours, avec des concentrations respectives de 20,3 et 32,1 ng/g. De même, les teneurs en FB1 dans les muscles ont augmenté de 0,036 à 4j à 0,072 ng/g à 9 jours. L'administration de cette argile intercalée grâce à des extraits d'algues (AC) a permis de réduire l'accumulation de FB1 de 40% dans le foie et de 50% dans les muscles au 9ème jour d'exposition. La diminution de la concentration en FB était accompagnée d'une diminution des teneurs en Sa et en So dans le foie. En conclusion, cette étude montre pour la première fois que les fumonisines sont bioaccumulables et que l'administration d'argile modifiée grâce à des extraits d'algues permet de diminuer cette accumulation.

## ABSTRACT

### **Bioaccumulation of fumonisins in broilers tissue with or without intercalated clay with algae extract**

Fumonisin are mycotoxins found worldwide for which maximum levels are recommended in animal feed. In poultry, the toxicity of these compounds occurs at low doses by liver damage and decreased performance. The toxicokinetic of fumonisins are characterized by poor oral absorption and rapid elimination from plasma. It was thus long considered that fumonisins (FB) don't accumulate in animals. Nevertheless, recent studies in poultry demonstrated that the hepatic half-elimination of fumonisin B1 (FB1) was up to several days suggesting that fumonisins can accumulate in animal tissues. Based on this latest research the aim of this study was to evaluate fumonisins deposit in broiler tissues and to evaluate the effect of an algo-clay on that accumulation. 21day old broilers were slaughtered after being fed a diet with 20 mg FB1+FB2/kg (considered as nontoxic) during 4 or 9 days prior to slaughtering. No sign of toxicity was observed on performances at this level of FB in feed, but increased concentrations of sphinganine (Sa) and sphingosine (So), used as biomarker of exposure, over time in liver were measured. An accumulation resulting from 4 to 9 days of exposure of FB1 was measured in liver with concentrations of respectively, 20.3 and 32.1 ng FB1/g observed at these two exposure periods. Even if FB1 level were very low in breast muscles, an accumulation could also be observed after 4 days to 9 days exposure with concentrations of 0.036 and 0.072 ng FB1/g, respectively. When feeding intercalated clay with algae extract, algoclay (AC) a significant reduction of FB1 accumulation was measured in liver and muscle by respectively, around 40 and 50% after 9 days of exposure. Broilers fed AC also showed a decrease in Sa and So contents in the liver compared to the levels of Sa and So measured in broilers fed FB alone after 9 days exposure. To conclude, this study highlights for the first time that fumonisins can accumulate in animals' tissues and that the inclusion of modified clay (with algae) allows to reduce this accumulation.

## INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par les moisissures qui peuvent contaminer les aliments consommés par les animaux et l'homme. Il est estimé que 25% de la production mondiale de céréales est contaminée en mycotoxines pendant la récolte, le transport, le stockage et la transformation (FAO 2003). Il existe 6 grands types de mycotoxines réglementées dans les aliments : aflatoxines, ochratoxines, déoxynivalénol, Toxine T2 et HT2, zéaralénone et fumonisines. Parmi ces dernières, les fumonisines du groupe B (FB) sont les plus répandues et les plus étudiées, et parmi elles, la fumonisine B1 (FB1) et dans une moindre mesure la fumonisine B2 (FB2) sont les plus abondantes et les plus toxiques (Voss *et al.*, 2007, Scott *et al.*, 2012 ; Guerre *et al.*, 2016 ; Knutsen *et al.*, 2018).

Chez les mammifères, la toxicité des fumonisines et les manifestations cliniques varient fortement selon l'espèce, la dose, et la durée de l'exposition (Knutsen *et al.*, 2018 ; Diaz *et al.*, 1994 ; Riley *et al.*, 2019). Chez l'homme, la consommation de FB a été associée à une incidence accrue de cancer de l'œsophage, conduisant le Centre international de recherche sur le cancer à classer les FB dans le groupe 2B, comme « possible cancérigène pour l'homme » (IARC 2002). Une dose journalière tolérable en FB pour la consommation humaine a été établie, et des niveaux maximaux tolérables en FB ont été fixés dans les aliments pour animaux ainsi que dans les matières premières destinées à la consommation animale (Knutsen *et al.*, 2018 ; WHO 2011). Afin de diminuer les effets négatifs des mycotoxines chez l'animal, la commission européenne a défini en 2009 une nouvelle catégorie d'additifs visant à la réduction de la contamination en mycotoxines des aliments ((EC) No 386/2009)) utilisable dans des contextes de faibles/moyennes contaminations ((EC) No 576/2006)).

L'un des paradoxes lié à la toxicité des FB concerne la relation entre leur toxicité et leur toxicocinétique. En effet, la plupart des études sur les animaux ont conclu que la toxicité des FB est cumulative (Knutsen *et al.*, 2018 ; Diaz *et al.*, 1994). Chez les espèces aviaires, l'exposition prolongée de canards et de dindes à de faibles doses de FB a entraîné une augmentation progressive de la sphinganine (Sa) et de sphingosine (So) dans le foie, Sa et So étant des marqueurs reconnus d'exposition et de toxicité des FB (Tardieu *et al.*, 2006 ; Benlasher *et al.*, 2012). Cependant, les études de toxicocinétique menées chez les espèces aviaires et chez les mammifères ont révélé que les FB sont rapidement éliminées du sang, ce qui apparaît contradictoire avec une toxicité de type cumulatif (Knutsen *et al.*, 2018 ; Guerre *et al.*, 2015).

L'objectif de cette étude est de mesurer l'accumulation de fumonisines dans le foie et les muscles chez le poulet de chair et d'évaluer

l'efficacité d'argile intercalée grâce à des extraits d'algues (Technologie algoclay, AC) pour réduire cette accumulation. Ces études ont été conduites avec un aliment naturellement contaminé à 20 mg FB1 + FB2/kg, niveau maximal recommandé par l'Union Européenne.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Schéma expérimental

L'essai a été réalisé au sein de la station expérimentale de Cebiphar (37 230 Fondettes, France). Un total de 70 poulets de chair a été divisé en 7 groupes (Tableau 1). L'allotement a été réalisé à 10 jours d'âge pour garantir une homogénéité de poids au démarrage de l'exposition. Les poulets de chair étaient soit exposés aux fumonisines (FB) seules, soit à AC seule, soit aux fumonisines et à l'AC (FB + AC), pendant 4 ou 9 jours avant l'abattage à 21 jours d'âge.

Les aliments contaminés ont été produits par Tecaliman (44 323 Nantes, France) à partir d'un maïs fortement contaminé en fumonisines pour obtenir une concentration finale dans l'aliment de 20 mg FB1+FB2/kg. L'AC a été incorporé dans les aliments à la concentration de 450 mg/kg. Les aliments ont été formulés sur une base maïs et soja et ont été distribués, ainsi que l'eau, à volonté. La contamination en mycotoxines de tous les aliments a été analysée en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC MS/MS). Les mycotoxines autres que les fumonisines n'ont pas été quantifiées à des niveaux significatifs.

### 1.2. Performances zootechniques

Des pesées individuelles des poulets ont été réalisées aux jours 1, 10, 17 et 21. La consommation d'aliment a été mesurée sur les périodes allant des jours 6 à 12 puis 13 à 16 et enfin 17 à 21.

### 1.3. Fumonisines dans le foie et dans le muscle pectoral

Des fractions de foie et muscles ont été collectées à l'abattage et stockées à -80°C jusqu'à analyse. La teneur hépatique des bases sphingoides a été mesurée en fluorescence après séparation HPLC et dérivatisation avec de l'orthophtaldialdéhyde (Tran *et al.*, 2003).

La concentration en FB1 et FB2 dans les tissus a été déterminée par UHPLC-MS/MS après incorporation d'isotopes marqués et purification des échantillons par immuno-affinité (Tardieu *et al.*, 2019).

### 1.4 Analyses statistiques

Les données expérimentales ont été analysées par ANOVA (XLSTAT).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Aucun effet sur les performances (consommation d'aliments, croissance, et indice de consommation) et aucune altération de santé (biochimie non spécifique, analyse macroscopique des organes à l'autopsie) n'a été observée dans cette étude.

## 2.1 Bases sphingoides

La teneur en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) a été mesurée dans les foies pour révéler les effets de la FB sur le métabolisme des sphingolipides, et calculer le rapport Sa/So (Tableau 2). L'aliment contaminé en FB distribué pendant neuf jours a entraîné une augmentation significative de la teneur en Sa et So dans le foie par rapport aux témoins non exposés. Cette augmentation a été significativement plus faible chez les poulets nourris avec l'aliment FB+AC que chez les poulets nourris avec l'aliment contaminé seul. A quatre jours d'exposition, aucune différence significative du rapport Sa/So n'a été observée entre le groupe nourri avec l'aliment FB+AC et le groupe nourri avec l'aliment FB seul.

Les effets de la FB sur Sa, So et Sa/So sont en accord avec la plupart des données de la littérature sur les poulets de chair nourris à ce niveau en FB dans l'aliment (Metayer *et al.*, 2019 ; EFSA 2005). En effet, une augmentation à la fois de la teneur en Sa et So est considérée comme une conséquence de l'inhibition des céramides synthèses due à la FB : les niveaux de la So augmentent généralement moins et plus tard que ceux de la Sa (Riley *et al.*, 2019).

## 2.2 Fumonisines dans le foie

Les concentrations en FB1 dans les foies de poulets nourris avec l'aliment FB et FB+AC sont présentées dans la figure 1. Une concentration moyenne en FB1 de 20,3 ng/g dans le foie a été observée chez les poulets nourris avec l'aliment FB pendant quatre jours. Cette concentration passe à 32,1 ng/g après neuf jours d'exposition. Cette différence entre les deux groupes était significative. Bien que plusieurs études aient déjà rapporté la présence de FB1 dans le foie de poulets exposés, il s'agit de la première étude qui démontre que la FB1 peut s'accumuler dans le foie quand la durée de l'exposition augmente.

La preuve de l'accumulation de la FB dans le foie est surprenante compte tenu de son élimination plasmatique rapide (Knutsen *et al.*, 2018). En effet, chez les volailles, le temps de demi-élimination plasmatique de la FB1 varie de 70 à 214 min chez les poulets de chair, les poules pondeuses, les canards et les dindes. De même, des temps de demi-élimination de 12 et 32 min ont été rapportés pour la FB2 chez les dindes et canards (De Baere *et al.*, 2018). Toutefois, différents travaux préalables ont révélé que l'élimination hépatique de la FB1 pouvait prendre plusieurs jours, ce qui est en accord avec la mise en évidence de son caractère bio-accumulable dans cet organe (Fodor *et al.*, 2008 ; Tardieu *et al.*, 2021). Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec la plupart des études menées sur la toxicité subaiguë des FB, qui ont

montré que la toxicité des FB était cumulative (Voss *et al.*, 2007 ; EFSA 2005 ; Marasas *et al.*, 1988 ; Kellerman *et al.*, 1990). Ce travail suggère par ailleurs que l'accumulation tissulaire des FB pourrait conduire à une augmentation de l'exposition humaine à ces contaminants, les apports alimentaires par les produits animaux étant à ce jour considérés comme négligeables.

La distribution de l'aliment FB+AC, entraîne une diminution non significative de la teneur en FB1 hépatique après quatre jours d'exposition, par rapport aux poulets nourris avec l'aliment FB seul. En revanche, après neuf jours d'exposition, la concentration dans le foie en FB1 chez les poulets nourris avec l'aliment FB+AC était de 18,6 ng/g contre 32,1 ng/g chez les poulets nourris avec l'aliment FB seul. Cette différence entre les deux groupes était significative. Ainsi, la supplémentation en AC a permis une diminution de 42% de la concentration en FB1 dans le foie par rapport à la concentration mesurée chez les poulets nourris avec l'aliment FB seul.

## 2.3 Fumonisines dans le muscle

La figure 2 montre les concentrations en FB1 dans le muscle chez les animaux nourris avec l'aliment FB et l'aliment FB+AC. Ainsi, on observe une augmentation de la teneur en FB1 dans le muscle au cours du temps chez les animaux nourris avec l'aliment FB passant de 0,047 ng/g à quatre jours d'exposition à 0,074 ng/g à neuf jours d'exposition. Cette différence entre ces deux groupes était significative. L'augmentation de la concentration dans le muscle lorsque la durée d'exposition augmente est cohérente avec ce qui a été observé dans le foie.

Pour ce qui est des poulets nourris avec l'aliment FB+AC, on observe une diminution non significative de la concentration en FB1 après quatre jours d'exposition par rapport aux poulets nourris avec l'aliment FB seul. En revanche, à neuf jours d'exposition, les concentrations en FB1 étaient de 0,035 ng/g chez les poulets nourris avec l'aliment FB+AC contre 0,074 ng/g chez les poulets nourris avec l'aliment FB seul. Cette différence entre les deux groupes était significative. Ainsi, comparativement aux poulets nourris avec l'aliment FB seul, la supplémentation en AC a permis une diminution de 53 % de la concentration en FB1 dans le muscle.

## CONCLUSION

Cette étude est la première à démontrer une accumulation de fumonisines dans les tissus de poulet de chair abattus à 21 jours sans signe de toxicité ou baisse de performance. Cette accumulation peut être significativement réduite en présence d'argile modifiée grâce à des extraits d'algues (AC). De nouvelles études sont nécessaires pour confirmer cette accumulation au cours de plus longues périodes d'exposition et à différents âges à l'abattage.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Benlasher, E.; Geng, X.; Nguyen, N.T.X.; Tardieu, D.; Bailly, J.-D.; Auvergne, A.; Guerre, P. Comparative Effects of Fumonisin on Sphingolipid Metabolism and Toxicity in Ducks and Turkeys. *Avian Dis.* 2012, 56, 120–127.
- De Baere, S.; Croubels, S.; Novak, B.; Bichl, G.; Antonissen, G. Development and Validation of a UPLC-MS/MS and UPLC-HR-MS Method for the Determination of Fumonisin B1 and Its Hydrolysed Metabolites and Fumonisin B2 in Broiler Chicken Plasma. *Toxins* 2018, 10, 62.
- Diaz, G.J.; Boermans, H.J. Fumonisin Toxicosis in Domestic Animals: A Review. *Vet. Hum. Toxicol.* 1994, 36, 548–555.
- European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a Request from the Commission Related to Fumonisin as Undesirable Substances in Animal Feed. *EFSA J.* 2005, 235, 1–32.
- Fodor, J.; Balogh, K.; Weber, M.; Miklós, M.; Kametler, L.; Pósa, R.; Mamet, R.; Bauer, J.; Horn, P.; Kovács, F.; et al. Absorption, Distribution and Elimination of Fumonisin B (1) Metabolites in Weaned Piglets. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2008, 25, 88–96.
- Guerre, P. Fusariotoxins in Avian Species: Toxicokinetics, Metabolism and Persistence in Tissues. *Toxins* 2015, 7, 2289–2305.
- Guerre, P. Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations. *Toxins* 2016, 8, 350.
- International Agency for Research on Cancer–IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene; IARC: Lyon, France, 2002; 590p.
- Kellerman, T.S.; Marasas, W.F.; Thiel, P.G.; Gelderblom, W.C.; Cawood, M.; Coetzer, J.A. Leukoencephalomalacia in Two Horses Induced by Oral Dosing of Fumonisin B1. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 1990, 57, 269–275.
- Knutsen, H.; Alexander, J.; Barregård, L.; Bignami, M.; Brüschweiler, B.; Ceccatelli, S.; Cottrill, B.; Dinovi, M.; Edler, L.; EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); et al. Risks for Animal Health Related to the Presence of Fumonisin, Their Modified Forms and Hidden Forms in Feed. *EFSA J.* 2018, 16, e05242.
- Marasas, W.F.; Kellerman, T.S.; Gelderblom, W.C.; Coetzer, J.A.; Thiel, P.G.; van der Lugt, J.J. Leukoencephalomalacia in a Horse Induced by Fumonisin B1 Isolated from *Fusarium Moniliforme*. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 1988, 55, 197–203.
- Metayer, J.-P.; Travel, A.; Mika, A.; Bailly, J.-D.; Cleva, D.; Boissieu, C.; Guennec, J.L.; Froment, P.; Albaric, O.; Labrut, S.; et al. Lack of Toxic Interaction Between Fusariotoxins in Broiler Chickens Fed throughout Their Life at the Highest Level Tolerated in the European Union. *Toxins* 2019, 11, 455.
- Riley, R.T.; Merrill, A.H. Ceramide Synthase Inhibition by Fumonisin: A Perfect Storm of Perturbed Sphingolipid Metabolism, Signaling, and Disease. *J. Lipid Res.* 2019, 60, 1183–1189.
- Scott, P.M. Recent Research on Fumonisin: A Review. *Food Addit. Contam. Part A* 2012, 29, 242–248.
- Tardieu, D.; Tran, S.T.; Auvergne, A.; Babilé, R.; Benard, G.; Bailly, J.D.; Guerre, P. Effects of Fumonisin on Liver and Kidney Sphinganine and the Sphinganine to Sphingosine Ratio during Chronic Exposure in Ducks. *Chem. Biol. Interact.* 2006, 160, 51–60. *Toxins* 2019, 11, 590. doi: 10.3390/toxins11100590.
- Tardieu, D.; Travel, A.; Metayer, J.-P.; le Bourhis, C.; Guerre, P. Fumonisin B1, B2 and B3 in Muscle and Liver of Broiler Chickens and Turkey Poults Fed with Diets Containing Fusariotoxins at the EU Maximum Tolerable Level.
- Tardieu, D.; Travel, A.; le Bourhis, C.; Metayer, J.-P.; Mika, A.; Cleva, D.; Boissieu, C.; Guerre, P. Fumonisin and Zearalenone Fed at Low Levels Can Persist Several Days in the Liver of Turkeys and Broiler Chickens after Exposure to the Contaminated Diet Was Stopped. *Food Chem. Toxicol.* 2021, 148, 111968.
- Tran, S.T.; Bailly, J.D.; Tardieu, D.; Durand, S.; Benard, G.; P Guerre. Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks. *Chem. Biol. Interact.* 2003, 146, 61–72.
- Voss, K.A.; Smith, G.W.; Haschek, W.M. Fumonisin: Toxicokinetics, Mechanism of Action and Toxicity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007, 137, 299–325.
- World Health Organization. Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. WHO Food Additives Series: 63. FAO JECFA MONOGRAPHS 8; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2011.

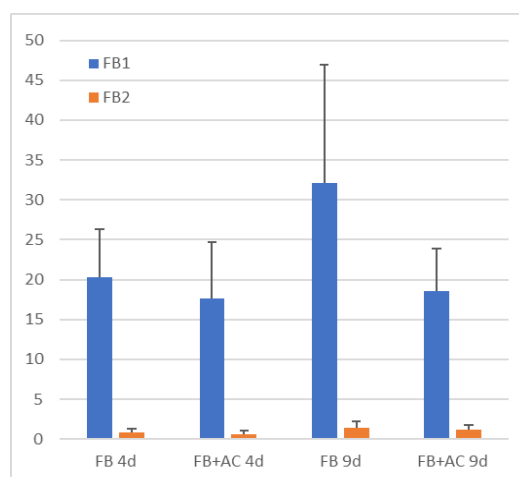
**Tableau 1.** Traitements expérimentaux.

| Traitement                          | Jours de traitement | Fumonisines (FB1+FB2) | AC         |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------------|------------|
| Témoin                              | -                   | -                     | -          |
| AC, 4 jours (AC 4j)                 | J16 – J21           | -                     | 0,450 kg/T |
| AC, 9 jours (AC 9j)                 | J13 – J21           | -                     | 0,450 kg/T |
| Fumonisines 4 jours (FB 4j)         | J16 – J21           | 20 ppm                | -          |
| Fumonisines 9 jours (FB 9j)         | J13 – J21           | 20 ppm                | -          |
| AC +fumonisines, 4 jours (FB+AC 4j) | J16 – J21           | 20 ppm                | 0,450 kg/T |
| AC +fumonisines, 9 jours (FB+AC 9j) | J13 – J21           | 20 ppm                | 0,450 kg/T |

**Tableau 2.** Bases sphingoides hépatiques mesurées chez des poulets nourris pendant 4 et 9 jours (d) avec régime témoin et régimes contenant des fumonisines (FB) et algo-argile (AC) et des fumonisines B + algo-argile (FB+AC) en nmol/ g.

| Variable1 | Control     | AC 4j       | AC 9j      | FB 4j       | FB+AC 4j    | FB 9j      | FB+AC 9j   |
|-----------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|
| Sa        | 0.66±0.3DE  | 0.37±0.18E  | 0.5±0.18DE | 0.93±0.23CD | 1.15±0.45C  | 2.48±0.96A | 1.88±0.71B |
| So        | 7.21±3.08BC | 3.74±1.16D  | 8.11±2.4B  | 6.63±2.19BC | 5.55±1.51CD | 11.86±4.1A | 8.14±2.04B |
| Sa/So     | 0.1 ±0.03BC | 0.11±0.06BC | 0.07±0.03C | 0.15±0.04B  | 0.21 0.06A  | 0.24±0.09A | 0.23±0.09A |

<sup>1</sup> Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD de 10 animaux par groupe. Une ANOVA a été réalisée pour comparer les groupes. Lorsqu'une différence significative a été observée ( $P < 0,05$ ), les moyennes ont été comparées (Duncan). Différentes lettres dans la même rangée identifient des groupes statistiquement différents ( $P < 0,05$ ).

**Figure 1** Teneur de la fumonisine B1 dans le foie des poulets de chair avec ou sans l'AC après 4 ou 9 jours d'exposition**Figure 2** Teneur en fumonisine B1 dans le muscle pectoral des poulets de chair avec ou sans l'AC après 4 ou 9 jours d'exposition