



**HAL**  
open science

# Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière

Stéphane Firmin

► **To cite this version:**

Stéphane Firmin. Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique : évaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22141 . tel-00673423v2

**HAL Id: tel-00673423**

**<https://theses.hal.science/tel-00673423v2>**

Submitted on 23 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,  
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***  
N° d'ordre 551

T h e s e

Présentée à l'Université Blaise Pascal  
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(SPÉCIALITÉ : NUTRITION ET SCIENCES DES ALIMENTS )

soutenue le 28 juin 2011

**STEPHANE FIRMIN**

---

**Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B1 et de l'ochratoxine A  
par un adsorbant organique :  
Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres  
toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière**

---

Directeur de thèse : Hamid Boudra

Président : M. Delbac Frédéric, Professeur, Université Blaise Pascal  
Membres : M. Alexandros Yiannikouris, Directeur de recherche, Alltech SAS  
M. Diego Morgavi, Directeur de recherche, INRA de Theix  
M. Hamid Boudra, Ingénieur de recherche, INRA de Theix  
Rapporteurs : Mme. Sylvaine Lecoer, Directrice de recherche, INRA de Lyon  
Mme Florence Forget, Directrice de recherche, INRA de Bordeaux

Préparée dans l'Equipe Digestion Microbienne et Absorption (DIMA)  
Unité de Recherches sur les Herbivores  
INRA centre Clermont-Ferrand / Theix

## REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit du partenariat entre l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT), l'Unité de Recherche sur les Herbivores de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Theix et la société Alltech, réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE (1058/2007).

Je remercie le Dr Gérard Bertin, responsable des affaires réglementaires européennes, Alltech S.A., pour m'avoir accordé votre confiance dans la réalisation de ce projet et m'avoir rendu accessible le monde de l'entreprise.

Je remercie le Dr Jean-François Hocquette, directeur de l'Unité de Recherche sur les Herbivores ainsi que le Dr Michel Doreau, responsable de l'équipe Digestion Microbienne et Absorption de m'avoir accueilli au sein de l'INRA.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont accepté de faire partie de ce jury: Le Dr Florence Forget, directrice de recherche, INRA de Bordeaux et le Dr Sylvaine Lecoeur Chargé de Recherche, INRA de Lyon, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Le Dr Frédéric Delbac, Professeur, Université Blaise Pascal, le Dr Alexandros Yiannikouris, coordinateur de recherche en glycobiochimie, Alltech S.A., le Dr Hamid Boudra, Ingénieur de recherche, INRA de Clermont-Theix et directeur de thèse ainsi que le Dr Diego Morgavi, directeur de recherche INRA de Clermont-Theix pour avoir eu la gentillesse d'accepter d'examiner ce manuscrit de thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements aux membres du comité de pilotage : Le Dr Jean-Pierre Jouany, retraité, le Dr Gérard Bertin, retraité, le Dr Alain Paris, Directeur de recherche, INRA Paris, le Pr Jean-Marie François, Directeur de recherche, Institut National Supérieur Agronomie Toulouse, le Pr Georges Houin, Directeur de recherche CHU Toulouse, le Dr Peggy Gandia, Maître de conférence, Université Paul Sabatier, Toulouse, le Dr Colm Moran, responsable des affaires réglementaires européennes, Alltech S.A., le Dr Hamid Boudra et le Dr Diego Morgavi.

Je tiens à remercier le Dr Thomas Ostfeld Larsen pour avoir accepté de nous donner accès à sa collection de moisissures productrices d'aflatoxines ainsi que le Dr Jean-Pierre

Cravedi pour avoir permis la réalisation du dosage des carcasses de rats au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Hamid Boudra et au Dr Diego Morgavi pour avoir veillé au bon déroulement de ce projet de thèse de sa conception à sa finalisation. Merci de votre disponibilité permanente, de vos compétences et de votre rigueur qui m'ont offert un encadrement de grande qualité.

Mes plus chaleureux remerciements au Dr Jean-Pierre Jouany pour m'avoir fait bénéficier de son expertise et la révision des articles. J'adresse mes remerciements les plus sincères au Dr Isabelle Veissier et le Dr Frédéric Glasser qui m'ont beaucoup apporté tant pour leur disponibilité que leurs commentaires, suggestions et leurs compétences.

Merci infiniment à tous les membres de la chaleureuse équipe DIMA, en particulier à David Alvarez, Dominique Graviou, Matthieu Silberberg, Didier Macheboeuf, Roger Bergault, Yves Papon ainsi que les nombreux stagiaires qui m'ont accompagné au laboratoire des fermentations.

Je tiens aussi à exprimer mon amitié à tout le personnel de la société Alltech et du centre INRA de Clermont-Theix pour le soutien qu'ils ont pu me témoigner à travers les épreuves et qui, par leur sympathie et leurs encouragements, m'ont donné la force d'achever le travail de thèse. Merci également à mes amis, Abder, Christelle, Hajer, Hann, Milka, Maggy et Jessy qui m'ont accompagné durant ces trois années.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Dr Michel Beckert, directeur du centre INRA de Clermont-Theix de m'avoir fait bénéficier d'une prolongation me permettant d'achever la rédaction de ce manuscrit de thèse dans les meilleures conditions.

Merci à toute ma famille, mes parents, mes frères, ma sœur et son époux, mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines qui ont toujours cru en moi et qui me sont restés fidèles malgré la distance.

Je dédie ce travail à Aurélie Reynaud, qui me manque toujours plus chaque jour. Merci de m'avoir aimé, de m'avoir fait aimer l'Auvergne et d'avoir fait de mes années de thèse à l'INRA les plus belles de mon existence.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	2
SOMMAIRE .....	4
LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS .....	7
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	9
LISTE DES ANNEXES .....	10
INTRODUCTION.....	11
I. STRUCTURE, TOXICITE, DEVENIR DES AFLATOXINES ET DES OCHRATOXINES DANS L'ORGANISME .....	17
A. Relation structure toxicité .....	17
1. Les aflatoxines.....	17
2. Les ochratoxines.....	18
B. Toxicocinétique (ADME) chez le ruminant.....	18
II. LES RISQUES LIES A LA CONTAMINATION DES ALIMENTS DESTINES AUX ANIMAUX.....	21
A. Les effets sur la santé animale.....	21
B. Les conséquences économiques .....	23
C. Le transfert dans les productions animales.....	24
1. La contamination des productions carnées.....	25
2. La contamination du lait et des produits laitiers.....	25
3. L'exposition de l'homme .....	26
III. QUELS SONT LES MOYENS POUR PREVENIR LA CONTAMINATION ? .....	27
A. Les mesures de prévention .....	27
B. Les méthodes de détoxification .....	28
1. Les agents de biotransformation .....	28
2. Les agents adsorbants .....	29
a. Les adsorbants inorganiques .....	29
b. Les adsorbants organiques .....	30
i. Les fibres végétales .....	30
i.1 Les fibres non digestibles.....	31
i.2 Les acides humiques.....	31
ii. Les parois de microorganismes .....	32
ii.1 Les bactéries fermentaires.....	32
ii.2 Les parois de levures .....	34
• Structure pariétale de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
• Mécanisme de séquestration des mycotoxines.....	35
• Les extraits de parois modifiées de levures.....	36
3. Evaluation de l'efficacité de détoxification des agents adsorbants .....	38
a. Etudes in vitro .....	38
b. Etudes in vivo.....	39
i. L'évaluation par les critères non spécifiques .....	39
i.1 Les mesures des performances animales.....	40
i.2 Mesure de la toxicité générale.....	41
ii L'évaluation par les critères spécifiques .....	42
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	45

PARTIE EXPERIMENTALE.....	50
I. EVALUATION DE L'EFFET D'UNE PREPARATION DE PAROIS DE LEVURE SUR L'ABSORPTION GASTRO-INTESTINALE DE L'AFB1 ET DE L'OTA CHEZ LE RAT.....	51
Acknowledgments.....	63
II. LE DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE.....	74
A. Les choix méthodologiques.....	74
1. Les marqueurs d'exposition.....	74
2. La détection fluorimétrique.....	74
B. L'optimisation des conditions analytiques.....	75
1. L'optimisation de la détection.....	75
2. L'optimisation de la séparation chromatographique.....	77
C. La procédure de validation.....	77
III. EVALUATION DE L'EFFET D'UNE PREPARATION DE PAROIS DE LEVURE SUR L'ABSORPTION GASTRO-INTESTINALE DES AFLATOXINES CHEZ LA BREBIS LAITIERE.....	80
DISCUSSION GENERALE.....	110
I. LA MESURE DES PARAMETRES SPECIFIQUES.....	114
A. L'effet de la paroi de levure sur les teneurs des mycotoxines dans les fèces et l'urine 114	
B. L'effet de la paroi de levure sur les teneurs des mycotoxines dans le sang et le plasma 115	
C. L'effet de la paroi de levure sur les teneurs des mycotoxines dans le lait.....	116
D. Les effets toxicocinétiques peuvent-ils s'expliquer par la séquestration des mycotoxines ?.....	118
II. LA MESURE DES PARAMETRES NON SPECIFIQUES.....	120
III. EST-CE QUE LES EFFETS TOXICOCINETIQUES ONT UNE SIGNIFICATION BIOLOGIQUE?.....	121
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	122
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	127
ILLUSTRATIONS.....	148
ANNEXES.....	172

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide desoxyribonucléique	GM : Glucomannanes
ADON : Acetyldeoxynivalenol	GPV : Gain de poids vif
AFB1 : Aflatoxine B1	GRAS : Generally Regarded As Safe
AFB2 : Aflatoxine B2	GSH : Gluthation
AFG1 : Aflatoxine G1	GST : Gluthation S-transferase
AFG2 : Aflatoxine G2	HSCAS : Hydrated sodium calcium aluminosilicate
AFL : Aflatoxicol	LLE: Extraction liquide-liquide
AFM1 : Aflatoxine M1	IAC : colonne d'immunoaffinité
AFM2 : Aflatoxine M2	IBV : Infectious Bronchitis Virus
AFP1 : Aflatoxine P1	IFN : Interferon
AFQ1 : Aflatoxine Q1	MDA : Malondialdehyde
AG : Acide gras	NIV : Nivalénol
AGV : Acide gras volatile	NV : Newcastle virus
ALP : Akaline phosphatase	K <sub>el</sub> : Constante d'élimination
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	OTA : Ochratoxine A
ARN : Acide ribonucléique	OT $\alpha$ : Ochratoxine $\alpha$
ARNt: ARN transferase	OTB : Ochratoxine B
AUC : Area under the curve (Aire sous la courbe)	PA: Prise d'aliment
CCM : Chromatographie sur couche mince	<i>p.o.</i> : per os.
CLHP : Chromatographie liquide haute performance	PV : Poids vif
C <sub>max</sub> : Concentration maximale	P450 : Cytochrome P450
CS : Cellules somatiques	RCA : Ratio de conversion alimentaire
DAD : Diode array detector	RX : Rayons X
DAS : Diacetyxscipenol	<i>Sc</i> : Saccharomyces cerevisiae
DL <sub>50</sub> : Dose létale 50	SNC: Système nerveux central
DON : Deoxynivalénol	SM : Spectrométrie de masse
EC: Equilibre des concentrations	SPE : extraction sur phase solide
EFSA: European food safety authority	TB: Taux butyreux
EROD: Ethoxyresorufin O-deethylase	TG: Taux de glycérides
ESB: Encéphalopathie spongiforme bovine	TGI : Tractus gastro-intestinal
FA: Acide fusarique	T <sub>max</sub> : Temps ou la concentration est maximale
FBM : Fibre de blé micronisé	TP: Taux protéique
FDA : Food and drug administration	T <sub>1/2</sub> : Demi-vie apparente d'élimination
FLD : Fluorimétrie	T2 : Toxine-T2
FND : Fibre non digestible	UV : Ultra violet
$\gamma$ -GT : $\gamma$ -glutamyl transpeptidase	YCW: Yeast cell wall
	ZEN: Zearalénone
	4OH-OTA: 4-hydroxyochratoxine A

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1 .....	17
Figure 2. Bioconversion du 8,9-époxyde-AFB1. ....	17
Figure 3. Structure chimique des différentes ochratoxines et de leurs métabolites. ....	18
Figure 4. Toxicocinétique des xénobiotiques.....	19
Figure 5. Différentes formes de stress subis par les animaux d'élevage. ....	24
Figure 6. Vue schématique de la paroi cellulaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	34
Figure 7. Les conformations des $\beta$ -glucanes dans l'espace. ....	35
Figure 8. Modélisation de l'interaction entre une molécule d'AFB1 avec une molécule de $\beta$ - (1,3)-D-glucanes en simple hélice au niveau d'un branchement de trois unités glucopyranosyles en $\beta$ -(1,6)-D-glucanes. ....	35
Figure 9. Exemples de préparations contenant des parois de levure et leur application en alimentation animale. ....	35
Figure 10. Evaluation de l'efficacité de détoxification des mycotoxines par un agent adsorbant. .....	39
Figure 11. Les principaux paramètres toxicocinétiques sanguins utilisés pour l'évaluation in vivo de l'efficacité de détoxification des mycotoxines par un adsorbant.....	43
Figure 12. Les paramètres d'excrétion de l'AFM1 dans lait utilisés pour l'évaluation in vivo de l'efficacité de détoxification de l'AFB1 par un adsorbant chez le ruminant laitier. adsorbant chez le ruminant laitier. ....	43
Figure 13 . Chromatogrammes obtenus par CLHP-FLD d'extraits de fèces, d'urine et de lait d'un animal analysés (a) avant et (b) après exposition à de l'aliment contaminé en aflatoxines. (c) solution d'aflatoxines pures en mélange.....	78
Figure 14. Profil de distribution de l'AFM1 dans plasma d'une brebis exposée à de l'AFB1 obtenu par CLHP.....	116
Figure 15. Mécanisme général de l'excrétion lactée des aflatoxines. ....	117
Tableau 1. Voies majeures de bioconversion de l'AFB1 et de l'OTA et toxicité dans les systèmes biologiques.....	19
Tableau 2. Teneurs maximales tolérées en AFB1(A) et recommandées en OTA (B) en alimentation animale (en $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).....	22
Tableau 3. Présence des ochratoxines dans les produits carnés en Europe.....	25
Tableau 4. Présence des aflatoxines et des ochratoxines dans le lait et les produits laitiers en Europe. ....	25
Tableau 5. Pathologies chroniques humaines associées à la contamination alimentaire par les aflatoxines et les ochratoxines.....	26
Tableau 6. Macromolécules de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
Tableau 7. Capacité du Mycosorb à lier les mycotoxines.....	37
Tableau 8. Evaluation de l'efficacité de détoxification de l'AFB1 par le Mycosorb chez les principales espèces d'animaux d'élevage. ....	37
Tableau 9. Evaluation in vivo de l'efficacité de détoxification des aflatoxines et de l'OTA par des préparations à base de parois de levures par la mesure des paramètres spécifiques.....	43
Tableau 10 Récapitulatif des procédures analytiques développées pour analyser l'AFB1 et l'AFM1 dans l'urine et les fèces .....	74
Tableau 11. Conditions analytiques utilisées pour le dosage des aflatoxines B1 et M1 par CLHP-FLD.....	77

Tableau 12. Critères de performance des méthodes CLHP utilisées pour la quantification de l'AFB1 et l'AFM1 dans l'urine, les fèces et le lait. .... 78

Encadré 1. Quelques paramètres zootechniques et toxicologiques utilisés pour l'évaluation in vivo de l'efficacité de détoxification des mycotoxines par un adsorbant. .... 39

## **LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **- Publications originales dans des périodiques à comité de lecture :**

- Firmin, S., P. Gandia, D. P. Morgavi, G. Houin, J. P. Jouany, G. Bertin, and H. Boudra. 2010. **Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation.** Food Additives and Contaminants. Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment. 27(8):1153-1160.
- Firmin, S., D-P. Morgavi, A. Yiannikouris and H. Boudra. **Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes.** Journal of Dairy Sciences (soumis)

### **- Communications affichées dans des congrès à comité de lecture :**

- Firmin, S., P. Gandia, D. P. Morgavi, G. Houin, J. P. Jouany, G. Bertin, and H. Boudra. Worldwide Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains- ISM- septembre 2009, **Evaluation of a yeast cell wall preparation to reduce mycotoxins absorption in rats.**

### **- Communications orales:**

- Conseils scientifiques 2008, 2009, 2010 de l'URH (INRA Clermont-Theix, 13 mars 2008, 09 avril 2009, 26 mars 2010)
- Journées de l'école doctorale Sciences de la vie et de la santé 2010 (Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, 06 mai 2010)

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Mode opératoire. Méthode de dosage par CLHP et détection fluorimétrique de l'aflatoxine M1 dans l'urine .....	173
Annexe 2. Mode opératoire. Méthode de dosage par CLHP et détection fluorimétrique des aflatoxines B1, M1, G1, B2 dans les fèces.....	181
Annexe 3. Poster Congrès de l'International Society for Mycotoxicology (Tulln, 9-11 septembre 2009). Evaluation of a yeast cell wall preparation to reduce mycotoxins absorption in rats .....	190

# **INTRODUCTION**

Les filières d'élevage ont été perturbées à plusieurs reprises par des crises sanitaires de nature différente, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) en 1996 et 2000, la grippe aviaire fin 2005, ou très récemment, la contamination des viandes de porcs à la dioxine..... Ces événements ont eu pour conséquence de sensibiliser les consommateurs aux questions de sécurité alimentaire et de pousser les acteurs de la chaîne alimentaire à plus de vigilance en matière de qualité sanitaire des aliments.

Les premières mycotoxines ont été découvertes dans les années 1960 lors d'une intoxication massive en Grande-Bretagne ayant conduit à la mort de plus de 100 000 dindons qui avaient consommé du tourteau d'arachide contaminé par des aflatoxines. Ce fait a été à l'origine de la mise en évidence de la relation moisissure-toxine-pathologie permettant d'expliquer par la suite de nombreux cas de toxicoses chez les animaux d'élevage. Depuis, plus de 1000 métabolites de moisissures ont été identifiées (Cole et al., 2003), mais une partie seulement des métabolites (environ une trentaine) possédant expérimentalement un effet biologique sont retrouvés à des niveaux appréciables comme contaminants naturels des aliments. (Boudra et al., 2009). Les mycotoxines présentant un risque sanitaire sont les aflatoxines, les ochratoxines, la patuline, les trichothécènes, les fumonisines (FB), et la zéaralénone (ZEN) (AFSSA, 2009). Cependant, seules quelques mycotoxines majeures font l'objet d'une réglementation ou d'une recommandation au niveau européen concernant le seuil maximal de contamination dans l'alimentation animale : les aflatoxines, l'ochratoxine A (OTA), le deoxynivalénol (DON), la ZEN et les FB.

Les mycotoxines ont des structures chimiques et des effets toxiques très variés. Elles présentent une activité hépatotoxique, cancérigène, immunotoxique, néphrotoxique, hématotoxique, neurotoxique et altèrent le fonctionnement des organes de reproductions (CAST, 2003). Chez les animaux d'élevage, l'exposition aux mycotoxines peut se traduire par une baisse des performances zootechniques et l'altération de la santé animale. A cela, il faut ajouter un problème de sécurité alimentaire suite au passage de certaines mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans les productions animales, notamment le lait.

La contamination par les mycotoxines peut se faire aux différentes étapes de l'élaboration des aliments pour animaux. Elle débute au champ et se poursuit durant la conservation. Une grande diversité de denrées agricoles peut être contaminée par les mycotoxines mais ce sont surtout les productions céréalières qui constituent les principaux

vecteurs de la contamination chez l'animal. La FAO a estimé que 25 à 40 % des récoltes de céréales sont contaminées au niveau mondial. Une enquête récente réalisée par Binder et al., (2007) a montré que 50% des échantillons de céréales analysées produites en Europe présentent une contamination supérieure à 12 ppb d'aflatoxines, 3 ppb d'OTA, 156 ppb de DON, 72 ppb de ZEN et 432 ppb de FB.

La mise en place des mesures préventives basées sur le respect de bonnes pratiques culturales et de stockage permet de réduire le développement des moisissures et la production des mycotoxines. Mais à cause des aléas naturels (climat, intervention de rongeurs et d'insectes), l'agriculteur ne peut maîtriser tous les facteurs de contamination et garantir l'absence totale de mycotoxines dans les denrées agricoles. Ces contaminants alimentaires peuvent potentiellement être présents à des teneurs variables selon la composition et la provenance des ingrédients de la ration animale, justifiant le recours à la détoxification.

Des méthodes basées sur des procédés physiques et chimiques ont été testées principalement pour la détoxification des céréales, mais c'est la détoxification par des agents organiques (bactéries et levures) qui a été la plus étudiée ces dernières années. Ces agents organiques sont capables de dégrader les mycotoxines (agents de biotransformation) en métabolites moins toxiques ou inactifs, mais aussi de séquestrer les mycotoxines *in vitro* (agents adsorbants) (Niderkorn et al., 2006, Niderkorn et al., 2007, Yiannikouris et al., 2004b).

Parmi les stratégies envisagées pour la détoxification de l'alimentation animale, l'utilisation d'agents adsorbants organiques présente un intérêt majeur pour maîtriser la contamination mycotoxique durant la conservation et limiter les effets toxiques en réduisant la biodisponibilité des mycotoxines dans l'organisme des animaux d'élevage. De nombreuses études ont été effectuées dans ces domaines. Cependant, il reste à vérifier par des essais *in vivo* sur l'animal la stabilité des complexes «agent adsorbant-toxine».

Les études menées pour évaluer l'efficacité des adsorbants organiques ont été focalisées sur la mesure de la toxicité générale et des paramètres zootechniques d'animaux ayant reçus de l'aliment contaminé par les mycotoxines avec ou sans l'agent détoxifiant. Cependant, ces paramètres ne sont pas spécifiques, mais, également pas sensibles aux doses faibles d'exposition compatibles avec les niveaux de contaminations naturels des aliments pour animaux. Les résultats de ces évaluations ne sont pas fiables et ne permettent pas de

savoir si les agents organiques testés sont réellement capables de retenir les mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal (TGI) des animaux.

Pour évaluer l'efficacité d'un adsorbant de façon spécifique, il est nécessaire de doser et de suivre les mycotoxines dans les différentes matrices biologiques. La quasi-totalité des essais *in vivo* utilisant les paramètres spécifiques ont porté sur le transfert de mycotoxines dans le lait chez le ruminant laitier. Cependant, l'étude n'est réalisable que pour certaines mycotoxines ou leurs métabolites excrétés dans le lait. Une autre approche envisageable pour mesurer l'effet des adsorbants sur la biodisponibilité de toutes les mycotoxines consiste à comparer la balance d'excrétion (urine *vs* fèces) et les paramètres toxicocinétiques sanguins.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse est d'évaluer l'efficacité d'un adsorbant de mycotoxines à base de parois de levures fourni par notre partenaire industriel (Alltech, S.A.) chez deux modèles animaux, le rat et la brebis laitière.

Nous avons choisi de focaliser l'évaluation sur deux mycotoxines, l'aflatoxine B1 (AFB1) et l'ochratoxine A (OTA), lesquelles présentent une différence d'affinité pour la fixation à l'adsorbant organique testé (Devegowda et al, 1998a). De plus, cette évaluation étant menée avec un adsorbant commercialisé, il était souhaitable de le tester sur l'AFB1, la seule mycotoxine réglementée en alimentation animale.

Le choix du rat est justifié par la nécessité d'apporter une preuve du concept à de faibles doses compatibles avec les niveaux naturels de contamination de l'alimentation animale par les mycotoxines. Dans ce modèle expérimental, nous avons réalisé un suivi de la distribution de l'AFB1 et de l'OTA et de leurs métabolites dans l'organisme et les différentes voies d'excrétion par un marquage radioactif.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette synthèse bibliographique, je me focaliserai sur les deux mycotoxines choisies pour l'étude expérimentale, les aflatoxines et les ochratoxines.

Je ferai d'abord un bref rappel concernant la structure, la toxicité et le devenir de ces mycotoxines après leur ingestion par les ruminants.

J'aborderai ensuite les conséquences sanitaires et économiques engendrées par les aflatoxines et les ochratoxines ainsi que les aspects de sécurité alimentaire des productions animales.

Je présenterai l'état des connaissances concernant la maîtrise des contaminations par les aflatoxines et les ochratoxines en m'intéressant plus en détail sur les adsorbants organiques disponibles ou en développement permettant de traiter l'alimentation du ruminant. Les méthodes d'évaluation de l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des agents adsorbants seront décrites avec leurs avantages et leurs inconvénients.

## I. STRUCTURE, TOXICITE, DEVENIR DES AFLATOXINES ET DES OCHRATOXINES DANS L'ORGANISME

### A. Relation structure toxicité

#### 1. Les aflatoxines

Les aflatoxines regroupent 18 composés structurellement proches constitués par un assemblage d'une coumarine et de 3 furanes. Elles sont produites par des moisissures du genre *Aspergillus spp* (*A. flavus* , *A. parasiticus*). Les plus courantes dans la chaîne alimentaire sont l'AFB1, son métabolite l'AFM1 ainsi que l'aflatoxine B2 (AFB2), l'aflatoxine G1 (AFG1) et l'aflatoxine G2 (AFG2) (**Figure 1**).

L'AFB1 est le composé le plus abondant dans les aliments contaminés, mais aussi le plus toxique suivi par l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2 avec une toxicité décroissante (Cole and Cox, 1981). Cet ordre de toxicité s'explique par la structure de ces molécules. La présence d'une double liaison sur le cycle dihydrofurane de l'AFB1 et de l'AFG1 expliquerait la différence de toxicité avec leurs homologues AFB2 et AFG2. La différence de toxicité entre les aflatoxines du groupe B et G proviendrait de la substitution du cycle cyclopentone par un cycle lactone (Lee et al., 1981).

Le métabolisme est une étape essentielle de l'activité toxique des substances exogènes en général et des aflatoxines en particulier (McLean and Dutton, 1995). La biotransformation des groupements fonctionnels de l'AFB1 entraîne une réduction de la toxicité lors d'hydroxylations (Aflatoxine Q1 (AFQ1)) ou de O-déméthylations (Aflatoxine P1 (AFP1)) (Hsieh et al., 1974, Stoloff et al., 1972). Mais certains métabolites de l'AFB1, notamment l'AFM1, conservent une toxicité importante (Prandini et al., 2009). Le métabolisme peut aussi conduire à leur bioactivation par la formation de structures intermédiaires hautement réactives. C'est le cas de l'AFB1 qui peut subir une oxydation sur sa double liaison 8,9 en formant l'AFB1- 8,9 epoxide. Ce composé, instable et électrophile, peut interagir avec des composés contenant des sites nucléophiles comme les acides nucléiques et les protéines en formant des adduits (**Figure 2**). Cette action peut entraîner l'inhibition de la transcription et de la réplication des cellules, un stress oxydatif, l'altération du métabolisme lipidique ou une action choléstatique (McLean and Dutton, 1995).

## 2. Les ochratoxines

Les ochratoxines sont issues du métabolisme secondaire des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*) et *Penicillium spp* (*P. viridicatum*). Elles forment un groupe de composés contenant une dihydroisocoumarine chlorée couplée par une liaison amide à une molécule de L-phénylalanine (Phe) (**Figure 3**). Parmi les différentes formes d'ochratoxines produites par les moisissures, seules l'OTA et très rarement l'ochratoxine B (OTB) sont rencontrés comme contaminants naturels des aliments.

Chaque molécule d'ochratoxine diffère par son potentiel toxique. L'OTA et l'ochratoxine C sont les plus toxiques (Marquardt and Frohlich, 1992). L'absence de l'atome de chlore dans l'OTB, seule différence structurale avec l'OTA, réduit considérablement sa toxicité (Steyn, 1984). De la même façon, l'hydrolyse de l'OTA en ochratoxine  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) entraîne une perte de toxicité (Pitout, 1969).

A la différence des aflatoxines, la toxicité de l'OTA est peu liée à son métabolisme et provient essentiellement du groupement phe. Les modes d'action de l'OTA ont été étudiés et détaillés dans différents ouvrages de synthèse (Bayman and Baker, 2006, Pfohl-Leskowicz and Manderville, 2007, Ringot et al., 2006). L'OTA peut interférer directement avec le métabolisme cellulaire impliquant la Phe par analogie structurale. Elle entraîne une perte d'activité catalytique de la (Phe) ARNt synthétase, de la (Phe) hydroxylase hépatique et bloque les voies de synthèse des protéines, des ARN et de l'ADN. L'OTA est aussi un puissant inhibiteur de l'activité de la phosphoenolpyruvate carboxykinase impliquée dans la néoglucogenèse rénale. L'OTA peut réduire la respiration mitochondriale *in vitro* et générer des radicaux libres ce qui stimule la peroxydation lipidique, cause des dommages à l'ADN, perturbe l'homéostasie calcique et induit la mort cellulaire par apoptose.

### B. Toxicocinétique (ADME) chez le ruminant

Après l'ingestion d'aliments contaminés, les mycotoxines sont absorbées par le tractus gastro-intestinal (TGI), métabolisées, distribuées dans l'organisme et excrétées selon des mécanismes généraux, communs à tous les xénobiotiques (**Figure 4**).

L'AFB1 et l'OTA sont rapidement absorbées par diffusion passive et détectées dans le sang moins de 30 min après leur ingestion (Blank and Wolfram, 2009, Boudra and Morgavi,

2006, Trucksess et al., 1983). Le pic d'absorption varie selon la toxine et selon l'espèce animale entre 6h et 36h (Galtier et al., 2008, Helferich et al., 1986). Les études cinétiques indiquent que le passage des molécules s'effectue dès les premiers compartiments digestifs (rumen) et se poursuit jusqu'au niveau intestinal. L'OTA est principalement absorbée par l'intestin grêle de l'animal (Blank et al., 2003).

L'AFB1 et l'OTA peuvent subir des réactions de biotransformations de phase I (oxydo-réduction) (ex: AFM1, 4OH-OTA) et de phase II (conjugaison) (ex: GSH-AFB1, glucuronide-OTA) ce qui a comme conséquence de les rendre plus hydrophiles et de faciliter leur élimination par les voies urinaire et biliaire (Kuhn et al., 1995, Kuilman et al., 1998, Xiao et al., 1996). Ces réactions font intervenir divers systèmes enzymatiques conduisant à la formation d'un grand nombre de métabolites de toxicité variable (**Tableau 1**).

Chez le ruminant, des réactions de biotransformation ont lieu dans certains tissus de l'organisme (métabolisme tissulaire) mais aussi dans le tractus digestif avant et après leur absorption (métabolisme du microbiote). L'OTA est principalement hydrolysée en OT $\alpha$  dans le rumen par des estérases du microbiote capables de dégrader jusqu'à 100% d'OTA en conditions *in vitro* (Muller et al., 2001). *In vivo*, cette transformation est partielle puisqu'une partie de l'OTA ingérée se retrouve dans le sang et le lait et échappe ainsi à la dégradation (Boudra and Morgavi, 2006).

Le microbiote du rumen ne jouerait un rôle détoxifiant que pour l'OTA (Kiessling et al., 1984), l'AFB1 présente dans l'aliment étant très peu dégradée (<10% de la dose ingérée). De l'aflatoxicol (AFL), un métabolite obtenu par réduction de l'AFB1, peut être produit dans le rumen mais ne représente que 0,6% de la dose ingérée (Auerbach H. et al., 1998). La biotransformation de l'AFB1 a surtout lieu dans le foie et les muqueuses gastro-intestinales et correspond à des réactions d'oxydations assurées par des monooxygénases à cytochromes P450 et la conjugaison du 8,9-époxyde-AFB1 par des glutathion-S-transférases (Yiannikouris and Jouany, 2002). La combinaison efficace de ce système de détoxification hépatique expliquerait la moindre susceptibilité du ruminant vis-à-vis de la toxicité de l'AFB1 (Guerre et al., 1996b, Larsson et al., 1994, Lynch, 1972, Wisniewski et al., 1987).

Après leur absorption, les formes circulantes de l'AFB1 et de l'OTA sont majoritairement liées aux protéines plasmatiques (Dahlmann et al., 1998, Wong and Hsieh, 1980), ce qui retarde leur filtration glomérulaire et donc leur élimination rénale. Elles se

distribuent essentiellement dans les organes impliqués dans le métabolisme et l'épuration des xénobiotiques (foie et reins) mais peuvent être présentes à l'état de trace dans d'autres tissus comme le cœur, les poumons, le cerveau et les muscles (Lillehoj et al., 1979, Stubblefield et al., 1983).

L'AFB1 et l'OTA sont principalement excrétées dans les urines et les fèces. La part excrétée dans les fèces résulte d'une absorption partielle et d'une élimination des mycotoxines et de leurs métabolites par clairance hépatique. Bien que leur métabolisation soit différente, l'excrétion fécale semble aussi efficace et peut représenter jusqu'à 53% des doses reçues d'AFB1 et d'OTA dans certaines études (Helferich et al., 1986, Nip and Chu, 1979). La sécrétion biliaire des formes conjuguées de l'AFB1 est prépondérante (Guerre et al., 1996a). Les principaux métabolites retrouvés dans les fèces sont des aflatoxines conjuguées (Galtier, 1999). L'excrétion urinaire est également une voie importante d'élimination qui peut représenter 30% des doses d'AFB1 et 70% des doses d'OTA ingérées selon les conditions expérimentales (Helferich et al., 1986, Hohler et al., 1999). L'AFM1 et l'OT $\alpha$  sont les métabolites les plus abondants dans l'urine.

Chez le ruminant laitier, le lait représente une voie mineure d'excrétion des mycotoxines. La présence d'OTA et de son métabolite l'OT $\alpha$  ont été mis en évidence dans le lait de vache, de chèvre et de brebis exposées à de l'aliment contaminé (Boudra et al., 2005, Nip and Chu, 1979, Ribelin et al., 1978). Les essais conduits chez le modèle brebis ont montré que les taux n'excèdent pas 0.05% des doses ingérées en cas d'exposition chronique (Galtier et al., 2008). L'AFB1 absorbée par l'organisme est essentiellement excrétée dans le lait sous sa forme hydroxylée, l'AFM1, à des niveaux plus élevés que pour l'OTA. L'élimination de l'AFM1 par la glande mammaire des ruminants représente jusqu'à 0.1-2% de la dose ingérée chez la vache laitière (Fink-Gremmels, 2008a). Les taux excrétés peuvent atteindre 6% de la dose ingérée chez la vache à haute production laitière (Veldman et al., 1992).

*Le ruminant peut être exposé aux aflatoxines et aux ochratoxines en ingérant de l'aliment contaminé. Les propriétés physico-chimiques de ces contaminants alimentaires en font des toxiques capables de franchir la barrière digestive et de s'accumuler dans l'organisme de l'animal en cas d'exposition répétée (AFSSA, 2009). La présence des aflatoxines et des ochratoxines dans les aliments pour animaux à des niveaux de contaminations naturels peut avoir des conséquences potentiellement importantes en élevage.*

## **II. LES RISQUES LIÉS À LA CONTAMINATION DES ALIMENTS DESTINÉS AUX ANIMAUX**

### **A. Les effets sur la santé animale**

Chez l'animal, la toxicité des aflatoxines et des ochratoxines se manifeste sous la forme de toxicoses appelées « mycotoxicoses ». La sévérité des symptômes est nuancée par des différences de sensibilité en fonction de la dose reçue, de la durée d'exposition, de l'espèce, de l'âge, du sexe, de l'état de santé de l'animal ainsi que du type de ration et de la présence d'autres mycotoxines.

L'ingestion de céréales, de fourrages et autres produits provenant de plantes contaminées par les aflatoxines et les ochratoxines peut conduire au décès de l'animal, mais ces cas d'intoxication aigus sont le plus souvent la conséquence d'erreurs humaines et de conditions d'élevages précaires. En élevage, ce sont surtout les expositions chroniques à de faibles doses qui sont les plus redoutées. Les aflatoxines et les ochratoxines sont douées de propriétés génotoxique, tératogène, cancérogène, immunotoxique, hépatotoxique et néphrotoxique (CAST, 2003). Le cas fréquent de multi-contamination des rations alimentaires du bétail laisse craindre à des effets additionnels ou synergiques par rapport aux mycotoxines seules moins toxiques (Surai and Dvorska, 2005).

Le porc et les volailles sont les plus sensibles aux effets des aflatoxines et des ochratoxines (Kurmanov, 1977). Ces espèces sont particulièrement exposées aux contaminations du fait de pratiques alimentaires à risques orientées vers la consommation de céréales et de leur incapacité à dégrader les toxines avant leur absorption digestive (AFSSA, 2009, Hayes et al., 1978, Smith et al., 1976).

Les ruminants présentent une résistance à la toxicité des mycotoxines en raison de la présence d'une communauté microbienne dans la panse susceptible de les métaboliser ou de les séquestrer (Upadhaya et al., 2011). Cependant, cette capacité de détoxification est conditionnée par des conditions digestives stables et le maintien d'un écosystème microbien actif dans le rumen. Les régimes riches en concentrés, souvent utilisés chez le ruminant à haut potentiel de production sont responsables d'une acidification du contenu ruminal avec notamment une diminution de la population des protozoaires (Brossard et al., 2004) impliqués dans la détoxification des mycotoxines (Galtier and Alvinerie M., 1976). L'ingestion

d'aliments fermentescibles entraîne également une réduction du temps de vidange pré-stomacale au détriment de la neutralisation des mycotoxines dans le rumen.

Comme pour les espèces monogastriques, les animaux pré-ruminants sont sensibles aux effets des mycotoxines. Le rumen des animaux non sevrés ne possède pas toutes les caractéristiques et les fonctions existantes chez l'animal adulte. A la naissance, seule la caillette digère le lait. Le rumen forme une poche digestive non fonctionnelle et dépourvue de microorganismes détoxifiants (Fonty et al., 1984). L'écosystème digestif se met en place progressivement avec le passage de l'alimentation lactée à l'alimentation herbacée et est capable de détoxifier les mycotoxines dans les premières semaines qui suivent le sevrage.

En raison d'une alimentation complexe, les ruminants peuvent être exposés à un nombre variable plus important de mycotoxines que les animaux monogastriques. Les fourrages constituent une part importante de la ration du ruminant et peuvent présenter un risque supplémentaire d'apport de mycotoxines lorsqu'ils sont de mauvaise qualité ou que les procédés de conservation sont défectueux. Dans le cas de lots de fourrages contaminés, les animaux peuvent donc être exposés aux mycotoxines durant une longue période. De plus, l'alimentation des ruminants (fourrages conservés et concentrés) est moins contrôlée que celle des monogastriques. Les denrées alimentaires produites *in situ* à la ferme ne sont analysées que lors d'accidents d'élevage (Boudra, 2009).

Bien que le problème sanitaire soit moins prégnant que pour les monogastriques, la consommation d'aliments contaminés par les aflatoxines et les ochratoxines peut causer un certain nombre d'effets indésirables chez le ruminant: une chute des productions animales liée à l'altération de la qualité organoleptique et nutritive des aliments, l'apparition de troubles cliniques, une diminution de la fertilité, la prédisposition aux infections, ainsi que des échecs de stratégies vaccinales et thérapeutiques. Pour plus de détail sur les effets toxiques de ces mycotoxines, je vous renvoie aux études de l'AFSSA (2009), l'EFSA (2004b), de Fink-Gremmels et al., (2008b) et de Morgavi et al, (2008).

Afin d'abaisser le risque de toxicité à un niveau faible en Europe, des dispositions réglementaires ont été mises en place concernant la contamination de l'alimentation animale par les aflatoxines et sont en préparation pour l'OTA (**Tableau 2**). Des plans de surveillance et de contrôles sont réalisés régulièrement pour rechercher la présence d'aflatoxines et

d'ochratoxines dans l'alimentation du bétail et montrent que les teneurs sont généralement en conformité avec les valeurs fixées à 0.020 mg d'AFB1/kg d'aliment (Directive 2002/32/CE) et 0.250 mg d'OTA/kg d'aliment (Directive 2006/576/CE) (Galtier et al., 2008).

La fixation de ces normes sanitaires garantit un niveau de sécurité alimentaire acceptable. Cependant, il est indispensable d'évoquer la difficulté d'estimer les risques posés par l'ingestion répétée de mycotoxines sur le moyen et le long-terme. Les seuils réglementaires sont calculés sur la base du régime et de sensibilité de chaque espèce animale sans tenir compte de la durée d'exposition ou de la présence d'autres mycotoxines dans l'aliment contaminé. L'exposition sur de longues durées à de très faibles doses et les interactions toxiques qui s'opèrent entre mycotoxines et d'autres agents pathogènes pourraient avoir des conséquences sanitaires chez le ruminant. Ces effets sont encore mal connus et peuvent être à l'origine de symptômes non spécifiques. Les infections opportunistes sont les plus redoutés en raison des propriétés immunosuppressives des aflatoxines et des ochratoxines à faibles doses. Cette toxicité est parfois suspectée lors de toxicoses naturelles en élevage sans qu'un diagnostic de certitude puisse être établi.

## **B. Les conséquences économiques**

La contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines occasionnent des coûts économiques directs et indirects pour la filière d'élevage. Les pertes directes sont dues à l'altération de l'aliment par les moisissures. Le développement fongique peut conduire à la destruction de la récolte lorsque le végétal est fortement attaqué et que le grain et les fourrages sont rendus inconsommables. Dans d'autres cas, la croissance des moisissures se traduit par une altération sensorielle et nutritionnelle des récoltes (diminution des teneurs en matière sèche, matière azotée et glucides) responsable d'un refus ou une diminution de l'ingestion par l'animal. Dans ces situations, la ration contaminée ne couvre pas les besoins énergétiques de l'organisme. Les animaux en bas âges ou en lactation réagissent très rapidement par un ralentissement de leur croissance ou par une chute de la production laitière. Une perte importante de rendement et de la valeur alimentaire des récoltes peut pousser les

fermiers à l'achat d'aliments et d'ingrédients complémentaires, ou à la vente prématurée d'animaux en période de déficit alimentaire.

Les pertes indirectes sont causées par la production de mycotoxines indépendamment de la qualité des récoltes. La présence de mycotoxines sur les aliments peut entraîner une baisse du revenu de l'éleveur par la chute de la productivité des animaux de rente auxquelles s'ajoutent des frais de soins vétérinaires (vaccination, antibiothérapie). Des dépenses supplémentaires liées à la mise en place de réglementations (enquêtes et analyses de l'aliment), l'investissement en recherche et la mise en œuvre de moyens de prévention et de détoxification des aliments (emploi de conservateurs et d'additifs) peuvent également être comptabilisées dans le coût économique de la contamination des aliments pour animaux par les mycotoxines.

Il est très difficile d'évaluer l'impact des contaminations alimentaires par les mycotoxines sur l'économie agricole avec précision (Wu, 2007) mais les répercussions financières peuvent être considérables. A titre d'exemple, les pertes dues à la contamination des produits dérivés de la fermentation des grains de maïs par les fumonisines vont varier de 4 à 147 millions de dollars par an dans l'industrie porcine selon leur niveau d'inclusion dans la ration (Wu and Munkvold, 2008). Le manque à gagner pour l'industrie agro-alimentaire imputable aux aflatoxines et ochratoxines est difficilement chiffrable d'autant plus que la contamination des aliments n'est pas toujours décelée et que ses conséquences sanitaires peuvent passer inaperçues. Sur le terrain, différents facteurs d'agression, comme le climat, les changements d'environnement, le bruit, une forte densité d'animaux peuvent également être source de stress et contribuer à l'apparition de toxicoses (**Figure 5**). Les pertes de revenus dues aux aflatoxines et ochratoxines sont potentiellement élevées et pénalisantes pour l'ensemble de la filière d'élevage.

### **C. Le transfert dans les productions animales**

La contamination par les mycotoxines génère des tensions sanitaires tout au long de la chaîne alimentaire, du producteur d'aliment pour animaux de ferme jusqu'aux produits finis consommés par l'homme. Cela est particulièrement vrai pour les aflatoxines et les ochratoxines dont le transfert dans le lait et les tissus comestibles comme le foie, le muscle,

les reins ont été rapportés dans des situations de contaminations naturelles (**Tableau 3** et **Tableau 4**).

## **1. La contamination des productions carnées**

Les ochratoxines ont été retrouvées essentiellement chez le porc dans les abats et les viandes crues, cuites ou séchées (saucisse, jambon, rognons, pâté) à des concentrations variant de quelques ng /kg à quelques µg /kg (Chiavaro et al., 2002). Les enquêtes menées chez le ruminant sont rares et montrent que les productions carnées ne sont pas contaminées par l'OTA (Skrinjar et al., 1992).

Les aflatoxines peuvent être détectées dans le foie, les reins et les muscles de volailles, de porc ou de ruminants en conditions expérimentales (Helferich et al., 1986, Zaghini et al., 2005a, Zaghini et al., 2005b). Leur présence sur le terrain n'est généralement constatée que dans les viandes de porc, de bovin et les charcuteries provenant de certains pays où la contamination des aliments pour animaux est fréquente à des niveaux élevés tel que l'Égypte, le Brésil, la Jordanie (Herzallah, 2009, Refai et al., 2003, Sabino et al., 1996).

## **2. La contamination du lait et des produits laitiers**

Les aflatoxines et ochratoxines peuvent être transférées de la ration animale contaminée au lait de mammifères. Contrairement aux autres types de productions, la contamination du lait est sous étroite surveillance et encadrée par une réglementation stricte vis-à-vis des aflatoxines. Des enquêtes sont réalisées régulièrement et montrent que la fréquence de la contamination des laits peut varier géographiquement (exploitations, pays) et temporellement (saison, année). Les taux d'AFM1 mesurés en Europe sont généralement conformes à la teneur réglementaire maximale de 50 ng/L (Boudra et al., 2007, Prandini et al., 2009). Des taux d'AFM1 supérieurs aux taux réglementaires sont parfois retrouvés dans le lait brut provenant certains pays d'Europe du sud, comme l'Italie (RASFF, 2003).

En revanche, peu d'études ont été réalisées sur l'OTA. La contamination du lait de consommation par les ochratoxines n'est pas réglementée et beaucoup moins contrôlée. Toutefois quelques travaux indiquent la présence d'OTA dans les conditions de contamination

naturelle des aliments (Boudra et al., 2007, Breitholtzemanuelsson et al., 1993). Cette excrétion ne concerne que 2 à 14% des échantillons de lait de vache analysés, mais à des teneurs ne dépassant pas 8 à 40 ng /L.

L'AFM1 est stable dans le lait et durant les différents processus de transformation du lait (Aly and Diekmann, 2010, Barbiroli et al., 2007, Govaris et al., 2002, Oliveira and Ferraz, 2007). L'OTA a également été montré stable à des températures allant jusque 200°C (Boudra et al., 1995). Cependant, il y a peu de données concernant son devenir durant les processus de transformation du lait. Sa présence dans le lait déshydraté et dans les fromages affinés suggère néanmoins que l'OTA n'est pas ou peu dégradée (Dall'Asta et al., 2008, Meucci et al., 2010) .

### **3. L'exposition de l'homme**

La contamination des productions animales par les aflatoxines et les ochratoxines est une préoccupation de sécurité alimentaire. Chez l'homme, les cas de mycotoxicoses aiguës sont rares et se déclarent plutôt dans les pays où la consommation de nourriture locale et l'agriculture de subsistance sont pratiquées (Shephard, 2008). En Europe, l'inquiétude porte essentiellement sur les effets chroniques en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence des aflatoxines et des ochratoxines résistantes aux procédés de transformation des produits alimentaires. L'AFM1 et l'OTA sont des cancérigènes reconnus chez l'homme. Des associations entre les contaminations alimentaires et des données épidémiologiques ou toxicologiques existent et suggèrent que ces mycotoxines contribuent à l'étiologie de différentes maladies chroniques (**Tableau 5**).

Malgré les risques évoqués, l'ingestion de lait et produits laitiers constitue un problème négligeable pour le consommateur adulte car les mycotoxines sont rarement retrouvées dans ces produits en Europe. Par ailleurs, la contribution des productions carnées et laitières dans l'apport alimentaire en mycotoxines est mineure par rapport à ceux représentés par les autres denrées alimentaires. Les aliments les plus contributeurs à l'exposition de l'homme par les aflatoxines et les ochratoxines sont les céréales. L'exposition des populations se fait également par l'ingestion d'arachides, de noix, de fruits secs, de vin, de bière, de café, de chocolat et d'épices (AFSSA, 2009).

En revanche, la présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans le lait pose un problème d'hygiène alimentaire. La consommation régulière de lait ou de produits laitiers contaminés est un facteur aggravant le risque de contamination pour une large population d'individus, notamment les individus les plus sensibles aux effets des mycotoxines. La présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans le lait utilisé en substitution au lait maternel, les yoghourts et les fromages démontrent le potentiel d'exposition des nourrissons et des enfants en croissance (Cano-Sancho et al., 2010, Meucci et al., 2010).

*La présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans la ration du ruminant à des niveaux de contaminations naturels ne constitue pas un problème de santé publique en Europe. Cependant, la demande croissante des consommateurs en matière de sécurité alimentaire, les préjudices économiques et la toxicité que ces mycotoxines occasionnent justifient de mettre en place des moyens de prévention et de détoxification de l'alimentation du ruminant.*

### **III. QUELS SONT LES MOYENS POUR PREVENIR LA CONTAMINATION ?**

Les aflatoxines et les ochratoxines étant essentiellement produites durant la conservation des céréales, l'éleveur peut mettre en place des mesures préventives pour abaisser les teneurs des mycotoxines dans les denrées qu'il produit et stocke à la ferme.

#### **A. Les mesures de prévention**

La phase de toxicogénèse étant toujours précédée par la phase de croissance de la moisissure, la prévention consiste principalement à limiter l'apport de l'inoculum d'*Aspergillus* et de *Penicillium* ainsi qu'éviter le développement des moisissures en appliquant des mesures ciblées sur les stades sensibles de la récolte et de la conservation des productions végétales. Ces mesures ne seront pas détaillées dans ce manuscrit. Pour plus de

détail, je vous renvoie aux publications suivantes: Amezceta et al, 2009, Chulze, 2010, Jouany, 2007, Magan and Aldred, 2007, Magan et al., 2010.

## **B. Les méthodes de détoxification**

L'éleveur peut envisager le recours à des additifs pour neutraliser les aflatoxines et les ochratoxines contenues dans les aliments qu'il distribue au bétail. On distingue 2 grandes familles d'additifs, qui selon leur mode d'action entraînent une diminution de l'exposition des animaux aux mycotoxines en réduisant leur biodisponibilité dans l'organisme: les agents de biotransformation et les agents adsorbants.

### **1. Les agents de biotransformation**

Un agent de biotransformation est un microorganisme ou une enzyme capable de dégrader ou convertir une mycotoxine en un produit moins toxique ou inactif.

Des progrès ont été réalisés ces dernières années dans le criblage d'organismes microbiens isolés du sol ou du tractus digestif d'animaux capables de biotransformer l'AFB1 et l'OTA (Awad et al., 2010, Wu et al., 2009). Certaines bactéries du sol (*Flavobacterium aurantiacum*, *Mycobacterium fluoranthinivorans*) et du microbiote du rumen (*Eubacterium* souche BBSH 797) dégradent l'AFB1 en utilisant la toxine comme source de carbone (Wu et al., 2009). D'autres agents comme le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* ou certaines souches d'*A. flavus* non toxigène sont capables de convertir l'AFB1 en AFL moins toxique. La levure *Trichosporon mycotoxinivorans* isolée de l'intestin de termite (Molnar et al., 2004) peut hydrolyser l'OTA en OT $\alpha$  et en phe non toxiques. Certaines enzymes (métalloenzyme, protéase, carboxipeptidase A et lipases) purifiées de souches de bactéries, de protozoaires et de moisissures sont également capables d'hydrolyser l'OTA (Abrunhosa et al., 2006, Abrunhosa and Venancio, 2007, Peteri et al., 2007, Stander et al., 2000, Varga et al., 2000).

L'utilisation d'agents de biotransformation pourrait être envisagée en élevage intensif pour compenser la perte d'activité de détoxification du rumen et gérer les risques de contamination des animaux à haut potentiel de production. L'usage d'enzymes présente le plus d'intérêt en permettant de s'affranchir des inconvénients liés à la manipulation et l'ajout de microorganismes vivants dans l'aliment (croissance aérobie/anaérobie, sécurité sanitaire

des aliments). Cependant peu d'information est disponible sur l'innocuité et l'efficacité des agents de biotransformation chez le ruminant, leurs effets sur la valeur nutritionnelle des aliments traités (Bata and Lasztity, 1999, Halasz et al., 2009, He et al., 2010, Jouany, 2007). Ainsi, une étude a récemment identifié *Trichosporon mycotoxinivorans* comme étant un agent pathogène responsable d'infections respiratoires chez l'homme (Hickey et al., 2009). Les seules études publiées *in vivo* ont néanmoins montré que l'addition de certains microorganismes (*Eubacterium* BBSH 797, *Trichosporon mycotoxinivorans* et *Nocardia corynebacteroides*) peut diminuer la toxicité chez des espèces monogastriques recevant une alimentation contaminée par du DON (Plank et al., 2009), de l'OTA (Politis et al., 2005) ou de l'AFB1 (Tejada-Castaneda et al., 2008). Dans ces études, l'apport de microorganismes vivants n'affecte ni l'état de santé des animaux, ni la valeur alimentaire de la ration.

Actuellement, la plupart des agents de biotransformation sont au stade d'étude au laboratoire contrairement aux agents adsorbants qui ont été utilisés sur le terrain.

## **2. Les agents adsorbants**

Un agent adsorbant est une substance qui est capable de séquestrer les mycotoxines dans le TGI de l'animal et de réduire leurs effets sur la santé de l'animal en facilitant leur élimination dans les fèces. Les agents adsorbants forment une famille hétérogène de composés d'origine minérale, microbienne, végétale, classés selon leur composition chimique en deux groupes : les adsorbants inorganiques et les adsorbants organiques.

### **a. Les adsorbants inorganiques**

Les adsorbants non organiques regroupent principalement les charbons actifs, les aluminosilicates (zéolites, bentonites, montmorillonites, aluminosilicates de sodium et de calcium (HSCAS)) et les résines synthétiques (cholestyramine).

Les adsorbants inorganiques ont été testés *in vitro* et *in vivo* dans le but de séquestrer les aflatoxines et les ochratoxines. Les résultats de ces essais ont été synthétisés dans différentes revues (Amezqueta et al., 2009, Huwig et al., 2001, Mezes et al., 2010, Ramos et al., 1996).

Les études réalisées chez le ruminant sont focalisées sur l'AFB1. Les argiles et charbons actifs sont pour la plupart efficaces pour séquestrer l'AFB1 *in vitro* et réduire *in vivo* l'excrétion d'AFM1 dans le lait (Kabak et al., 2006). Cependant ces agents montrent une

efficacité variable contre les autres mycotoxines. Aucune étude n'a été publiée sur la capacité des adsorbants inorganiques à réduire la biodisponibilité de l'OTA chez le ruminant. Les charbons actifs sont capables de séquestrer fortement l'OTA *in vitro* mais ne protègent pas des effets toxiques chez le poulet (Rotter et al., 1989). Certaines argiles (HSCAS, bentonite) ont une affinité *in vitro* pour l'OTA mais leur efficacité est nulle chez le porc (Plank et al., 1990). Seule l'efficacité de la cholestyramine sur l'OTA a été confirmée lors d'essais *in vivo* chez le rat par la réduction de son taux plasmatique et l'augmentation de son excrétion fécale (Kerkadi et al., 1998).

*D'une manière générale, les adsorbants inorganiques sont inadaptés à la détoxification de l'alimentation animale. Leur efficacité est discutable car des différences sont fréquemment observées entre les résultats des évaluations in vitro et in vivo. Ce sont des adsorbants de mycotoxines non spécifiques capables d'adsorber également les nutriments dans le tube digestif (minéraux, vitamines, acides aminés). Une utilisation intensive de ces produits, notamment dans le cadre d'un usage prophylactique, peut causer des carences (Huwig et al., 2001). L'inclusion d'adsorbants à des niveaux relativement élevés (jusque 5%) peut entraîner un effet de dilution de la ration alimentaire. L'ingestion d'argile conduit à un dépôt important dans les lisiers qui se répercute sur leur stockage et la qualité des sols sur lesquels ils sont épandus. Certains de ces agents adsorbants sont coûteux et peuvent être difficilement intégrés dans le cahier des charges des éleveurs (ex: cholestyramine).*

## **b. Les adsorbants organiques**

L'utilisation d'adsorbants organiques capables de lier les mycotoxines présente un avantage pratique, économique et écologique en comparaison aux adsorbants inorganiques. Ce sont des agents biodégradables dans l'environnement et qui fixent une gamme plus large de mycotoxines à des taux d'inclusion relativement bas (Diaz and Smith, 2005).

### ***i. Les fibres végétales***

Plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo* ont été récemment publiés sur la séquestration des aflatoxines et des ochratoxines par des agents à base de fibres végétales. Ces découvertes permettent d'envisager de nouvelles pistes de détoxification, cependant d'autres recherches sont nécessaires pour confirmer l'efficacité de ces agents organiques chez le ruminant.

### **i.1 Les fibres non digestibles**

Les Fibres Non Digestibles (FND) regroupent l'ensemble des composés fibreux présents dans les parois végétales capables de résister à l'activité hydrolytique des sécrétions enzymatiques et des microorganismes du tractus digestif. Ces fibres indigestes sont essentiellement constituées de polysaccharides non cellulosiques (ex: pectines) et de lignines qui participent à la digestion en influençant le poids, la viscosité ou le temps de transit du contenu digestif. Les FND jouent un rôle détoxifiant de par leurs propriétés diététiques. Elles sont capables de capturer et de favoriser l'excrétion fécale de différents xénobiotiques (Bandazhevskaya et al., 2004, Schneeman, 1999, Sera et al., 2005, Ta et al., 1999).

Les premiers essais sur mycotoxines menés dans les années 1980 ont montré qu'il était possible de retenir ces contaminants dans le tube digestif lors d'une exposition alimentaire en adaptant les animaux à un régime enrichi en plantes ligneuses. L'ajout de luzerne à hauteur de 20-25% de la ration réduit les effets de la ZEN chez le rat et la truie (James and Smith, 1982; Smith, 1980; Stangroom and Smith, 1984) et augmente l'élimination fécale de la toxine-T2 (T2) chez le rat (Carson and Smith, 1983). En revanche, une autre approche consistant à utiliser des fibres riches en pectines a été moins concluante. L'addition de pelures de pomme (8%) réduit les effets sur le gain de poids chez le porc exposé à du DON et de la ZEN mais ne protège pas des effets oestrogéniques (Gutzwiller et al., 2007).

L'usage des FND en tant qu'additif peut être raisonnablement envisagé avec l'introduction de procédés de micronisation qui réduisent la taille des fibres à l'échelle du micron. La micronisation des fibres permet d'accroître la capacité d'adsorption à l'égard des mycotoxines et de proposer des taux d'inclusion dans l'aliment plus bas, compatibles avec une application pratique. Une étude conduite *in vitro* a montré que les Fibres de Blé Micronisées (FBM) ont une affinité pour l'OTA en milieu liquide (Tangni, 2003). Leur efficacité a ensuite été confirmée *in vivo* chez le rat et le porc (Aoudia et al., 2009, Aoudia et al., 2008). Dans les deux études, l'addition de 1-2% de FBM à de l'aliment contaminé par 0.12 et 2 mg/kg d'OTA a entraîné une réduction significative de sa concentration dans le plasma, le foie et les reins.

### **i.2 Les acides humiques**

Les acides humiques sont des composés organiques extractibles de fibres végétales présentes dans le sol à différents états de décomposition (tourbe, léonardite ou la lignite). Issus de la condensation oxydative de la lignine, les acides humiques sont constitués de

noyaux aromatiques, d'hétérocycles oxygénés et azotés, reliés par des chaînes aliphatiques riches en groupements carboxyles dont les proportions varient selon le type de sol et le degré d'humification (Stevenson, 1994). Ce sont des molécules hétérogènes chargées négativement qui constituent d'excellents adsorbants de par leur capacité d'échange cationique. Les acides humiques trouvent de nombreuses applications en alimentation animale (Trckova et al., 2005). Ils sont utilisés pour fixer différents agents toxiques (métaux lourds, pesticides, toxines de bactéries pathogènes) mais ce n'est que récemment que les bénéfices des acides humiques ont été rapportés dans le cadre d'une contamination par les mycotoxines. Une première étude *in vitro* a mis en évidence la séquestration de l'AFB1 par de l'acide oxihumique ainsi que la stabilité des complexes formés pour une gamme de pH de 3 à 7 (Jansen van Rensburg et al., 2006).

Les propriétés adsorbantes des acides humiques ont également été démontrées *in vitro* avec deux fusariotoxines, la ZEN et la DON à des doses compatibles avec celles retrouvées dans l'alimentation. Les travaux montrent que des substances humiques de type léonardite, lignosulfonate sont capables de réduire jusqu'à 70% le taux de ZEN en solution tamponné à des pH simulant un transit gastro-intestinal chez le porc. L'effet sur la séquestration de la DON dans les mêmes conditions est médiocre (Sabater-Vilar et al., 2007).

*In vivo*, l'addition d'acide oxihumique (3,5%) réduit les effets d'une exposition prolongée aux aflatoxines sur le poids vif, les organes, les paramètres biochimiques et hématologiques mesurés chez le poulet (Jansen van Rensburg et al., 2006). Par la suite, deux autres études ont confirmé l'effet bénéfique sur la réponse vaccinale et infectieuse chez le poulet recevant de l'acide humique à raison de 2-10 g/kg d'aliment contaminé par des aflatoxines (0.254 ppm) (Ghahri et al., 2009, Hasan et al., 2010).

## ***ii. Les parois de microorganismes***

Deux groupes de microorganismes possèdent une structure pariétale capable de lier les mycotoxines: les bactéries fermentaires et les levures.

### **ii.1 Les bactéries fermentaires**

Les bactéries fermentaires capables de séquestrer les mycotoxines sont représentées par certaines souches de bifidobactéries et de bactéries lactiques. La séquestration de l'AFB1 et de l'OTA par ces bactéries a été principalement étudiée *in vitro* en solution tampon.

L'efficacité d'adsorption dépend notamment des souches étudiées (Niderkorn et al., 2006, Niderkorn et al., 2007, Peltonen et al., 2001) et de la taille de la population bactérienne (El-Nezami et al., 1998). Ainsi *Lactobacillus rhamnosus* VM04 et *Lactobacillus acidophilus* VM20 sont capables de séquestrer entre 2 et 96% d'OTA ; tandis que *Lactobacillus crispatus* M247 et *Lactobacillus rhamnosus* GG fixent entre 5 et 86% d'AFB1 (Fuchs et al., 2008, Haskard et al., 2000, Peltonen et al., 2000). La polarité des toxines joue aussi un rôle important dans le mécanisme de séquestration. C'est ainsi que le taux d'aflatoxines fixées diminue dans un ordre décroissant de polarité AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 (Haskard et al., 2000) et que l'AFM1 est éliminée avec moins d'efficacité que l'AFB1 (Pierides et al., 2000).

L'efficacité de séquestration des mycotoxines est comparable entre bactéries viables et bactéries thermolysées ce qui suggère que l'activité n'est pas due à l'activité métabolique des cellules vivantes (El-Nezami et al., 2002, Niderkorn et al., 2009).

D'autres essais *in vitro* ont été réalisés au sein de notre laboratoire par V. Niderkorn pour caractériser la séquestration des fusariotoxines par les bactéries fermentaires et évaluer la stabilité des complexes dans le tractus digestif des animaux. Ses travaux ont démontré que *Streptococcus thermophilus* RAR1 et *Lactobacillus paraplantarum* CNRZ1885 adsorbent les fumonisines au niveau de leur paroi. L'interaction fait intervenir le peptidoglycane de la paroi bactérienne et les bras d'acide tricarballoylique des fumonisines (Niderkorn et al., 2009). Les complexes formés entre la ZEN et les *streptococci* sont stables dans le contenu ruminal et les conditions simulant les compartiments post-ruminaux du tube digestif (Niderkorn et al., 2008).

Les rares études *in vivo* ont été publiées sur la capacité des bactéries fermentaires à diminuer la biodisponibilité des aflatoxines dans l'organisme d'espèces monogastriques. L'administration de bactéries lactiques serait susceptible de diminuer l'excrétion urinaire de l'AFB-N7-Guanine (marqueur d'exposition de l'AFB1) chez l'homme et d'augmenter l'excrétion fécale d'AFB1 et d'AFM1 chez le rat (El-Nezami et al., 2006, Gratz et al., 2006).

Aussi, compte tenu de leur rôle dans la conservation et la stabilisation aérobie des ensilages, l'emploi de bactéries fermentaires capables de séquestrer les mycotoxines peut apparaître comme une solution économique et pratique pour traiter l'alimentation des ruminants.

## **ii.2 Les parois de levures**

Des études ont montré l'efficacité des levures du genre *saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) à réduire la contamination par les mycotoxines (Bejaoui et al., 2004, Shetty and Jespersen, 2006). La séquestration des mycotoxines par les levures s'effectue au niveau de la paroi cellulaire (Yiannikouris et al., 2003). Les travaux portant sur les parois cellulaires de levures sont les plus nombreux et ont montré le plus d'efficacité dans la séquestration des mycotoxines.

Le terme « Parois de Levure » est employé dans la littérature scientifique pour qualifier, sans distinction de structure ou de composition, des substances organiques ayant comme origine la paroi cellulaire de différentes souches de levures. Les parois de levures sont produites par différents procédés technologiques. Elles regroupent des préparations contenant les fractions plus ou moins purifiées des constituants pariétaux dont la nature chimique et les teneurs peuvent varier qualitativement et quantitativement selon le processus de production utilisé. L'efficacité de séquestration de ces parois de levures peut donc être très variable.

- **Structure pariétale de *Saccharomyces cerevisiae***

La paroi de *Sc* est une enveloppe rigide entourant la membrane cytoplasmique de la levure. Elle représente entre 25 et 30% de la masse sèche totale de la cellule. C'est une structure hautement dynamique qui s'adapte aux stress et changements d'environnement par un renouvellement dans sa composition et son architecture. La teneur des principaux composants pariétaux varie selon la souche et les conditions de culture (**Tableau 6**). La paroi de *Sc* est organisée en une double couche d'une épaisseur de 100 à 200 nm chez *Sc*. La couche externe est constituée d'un réseau fibrillaire dense de mannoprotéines, la couche interne est une matrice transparente et amorphe de  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes associée à de la chitine. Les  $\beta$ -(1,6)-D-glucanes assurent la jonction entre les composants de la couche externe et ceux de la couche interne (**Figure 6**).

Les  $\beta$ -glucanes constituent la fraction interne de la paroi des levures. Ils sont composés d'un assemblage de chaînes linéaires de glucoses liés en  $\beta$ -(1,3) sur lesquelles sont greffées des ramifications latérales de glucoses liés en  $\beta$ -(1,6). La technique de diffraction aux RX montre que les chaînes de  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes sont organisées en forme d'hélice simple (6

unités de glucose par tour d'hélice) ou de triples hélices elles-mêmes assemblées en réseaux de triples hélices stabilisées par des liaisons électrostatiques (Kogan, 2000) (**Figure 7**).

- **Mécanisme de séquestration des mycotoxines**

Des études sur le mécanisme de séquestration des extraits pariétaux de *Sc* ont été menées dans le cadre de la thèse d'A. Yiannikouris réalisée dans notre laboratoire (Yiannikouris et al., 2004b, c). Dans ces études, les auteurs ont montré notamment que les  $\beta$ -D-glucanes assurent l'essentiel de l'adsorption des mycotoxines. Ils ont pu établir une corrélation entre la quantité de glucanes présents dans la paroi et sa capacité de séquestration, alors que la teneur en mannanes intervient peu et que la teneur en chitine a un effet négatif.

La modélisation moléculaire a permis de montrer que les mycotoxines sont fixées dans l'espace intra-hélicoïdal des  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes lorsque leur taille et leur forme le permet, et des liaisons chimiques s'établissent entre les glucanes et la toxine (Yiannikouris et al., 2004a, Yiannikouris et al., 2006). Des liaisons « hydrogènes » de faible énergie s'établissent entre les groupements hydroxyles des  $\beta$ -D-glucanes et les mycotoxines. Des interactions de Van der Waals moins stables sont créées entre les cycles des glucanes et les toxines générant des effets de tassement qui augmentent l'énergie de liaison des toxines. Les ramifications  $\beta$ -(1, 6)-D-glucanes recouvrent la partie externe des toxines qui sont ainsi ancrées dans l'axe central de l'hélice de  $\beta$ -(1, 3)-D-glucanes, ce qui stabilise le complexe (**Figure 8**).

Une étude sur la formation et la stabilité chimique du complexe a été réalisée entre la zéaralénone et les  $\beta$ -D-glucanes aux 3 pH mimant l'environnement du tractus digestif (pH 3, 6, 8). La séquestration est maximale en milieu acide (Yiannikouris et al., 2006, Yiannikouris et al., 2004d). Les  $\beta$ -(1, 3)-D-glucanes adoptent une conformation en hélice simple et en pelote en milieu alcalin défavorable à l'adsorption des mycotoxines. La présence de branchements  $\beta$ -(1, 6)-D-glucanes sur la chaîne de  $\beta$ -(1, 3)-D-glucanes limite l'effet du pH sur la séquestration en maintenant la conformation hélicoïdale active.

Figure 8. Exemples de préparations contenant des parois de levure et leur application en alimentation animale.

- **Les préparations à base de parois de levures et leurs applications en alimentation animale**

Bien que la séquestration des mycotoxines soit une activité répandue chez *Sc*, très peu de préparations à base de parois de *Sc* sont proposées pour la détoxification des aliments contaminés par les mycotoxines (**Figure 9**). Les levures ont des propriétés biologiques variées

et sont utilisées en alimentation animale comme compléments alimentaires et additifs zootechniques pour améliorer la valeur nutritive de la ration et les performances de production des animaux de rente. Elles peuvent réduire la toxicité de l'AFB1 *in vivo* (Abousadi et al., 2007, Baptista et al., 2002, Celyk et al., 2003, Stanley et al., 1993) mais n'agissent pas en qualité d'agents adsorbants. Des études récentes conduites chez le mouton ont montré que l'apport en levure *Sc* ne réduit pas la biodisponibilité de l'AFB1 et de l'OTA (Battacone et al., 2009, Blank and Wolfram, 2009). C'est également le cas de certaines préparations à base de D-mannose extraits de la couche externe de la paroi de *Sc* utilisées comme additifs pour renforcer les défenses immunitaires des animaux (Spring and Privulescu, 1998). Ces extraits de parois de levure appelés Mannanes-oligosaccharides sont doués de propriétés détoxifiantes vis à vis de l'AFB1 (Baptista et al., 2004, Zaghini et al., 2005b) mais ne séquestrent pas la toxine et ne sont pas considérés comme des agents de détoxification *sensu stricto* (EFSA, 2009).

Les agents adsorbants à base de paroi de levure ne regroupent que certaines préparations qui contiennent les  $\beta$ -D-glucanes de la couche interne de *Sc*. Les propriétés d'adsorption de ces préparations expliquent qu'elles sont généralement incorporées dans la ration expérimentale du bétail à des niveaux d'inclusion très bas pour diminuer les effets des mycotoxines, variant de 0.05% à 0.1% chez les espèces monogastriques et à des taux supérieurs, jusqu'à 0.2% chez les ruminants. A la différence des agents inorganiques, les préparations de parois de levures n'affectent pas la biodisponibilité des nutriments (minéraux, vitamines et acides aminés) et sont classé « Generally Regarded As Safe » (GRAS) pour une utilisation comme additif.

- **Les extraits de parois modifiées de levures**

L'identification de la structure responsable de la séquestration des mycotoxines a conduit à la fabrication de préparations industrielles à base d'extraits de parois modifiées de levures. Le produit que nous avons testé est l'une de ces préparations commercialisée sous le nom de MTB-100™ ou Mycosorb™ (Alletch, S.A.). Le Mycosorb est un mélange de  $\beta$ -glucanes isolé de la souche *Sc* 1026 dont la structure est altérée par stress chimique durant la croissance de la levure. Les groupements hydroxyles des résidus de glucoses et de mannoses

de ces parois subissent une estérification en présence d'alcool, augmentant la surface accessible à l'adsorption physique des mycotoxines.

Le Mycosorb a été testé sur plusieurs mycotoxines *in vitro* : Il est capable de fixer efficacement l'AFB1, la ZEN, et les fumonisines, mais avec une affinité moindre pour les autres mycotoxines, l'OTA, le Nivalenol (NIV) et la T2 (Devegowda, 2000) (**Tableau 7**). Le Mycosorb a été également efficace dans la séquestration des alcaloïdes de l'ergot de seigle et des endophytes (Dawson et al., 2001, Devegowda et al., 1998b, Newman, 2000) ou encore de l'aurofusarine, une toxine de *Fusarium* identifiée dans les blés cultivés en Ukraine (Dvorska et al., 2003).

Le Mycosorb est capable de séquestrer les mycotoxines dans les conditions simulant celles de l'appareil digestif des animaux. Son efficacité est dépendante de l'acidité et le pouvoir tampon du milieu (Devegowda et al., 1996). Le pH optimal de la séquestration des aflatoxines est à 4 (Dawson et al., 2001) alors que celui de l'OTA est à 6.5 (Devegowda et al., 1998a). Une élévation du pH du liquide ruminal réduit fortement la séquestration de l'AFB1 par le Mycosorb (Moschini et al., 2008).

Le Mycosorb a été testé sur plusieurs mycotoxines *in vivo* : son efficacité de détoxification contre l'AFB1 a pu être démontrée chez les principales espèces d'élevage (**Tableau 8**). Cet agent adsorbant réduit significativement les effets de l'aflatoxicose à des niveaux d'exposition extrêmes de 0.1 à 2 µg/Kg d'aliment chez les volailles. (Banlunara et al., 2005, Girish and Devegowda, 2006, Karaman et al., 2005). Le Mycosorb, lorsqu'il est inclus dans la ration du porc, atténue la toxicité hépatique provoquée par une exposition prolongée à de faibles doses d'AFB1 (jusqu'à 1.9 µg/kg d'aliment). Les effets s'accompagnent d'une restauration de l'immunité à médiation cellulaire stimulée par injection d'ovalbumine (Meissonnier, 2009).

L'efficacité *in vivo* du Mycosorb n'est pas démontrée contre les ochratoxines. Cependant, l'ajout d'adsorbant réduit les effets d'une exposition alimentaire multiple combinant les ochratoxines avec d'autres mycotoxines chez le poulet (aflatoxines et fusariotoxines) (Aravind et al., 2003; Raju and Devegowda, 2002).

Les études de l'évaluation de l'efficacité du Mycosorb se sont largement focalisées sur les fusariotoxines. L'inclusion du Mycosorb dans la ration contaminée prévient l'apparition de nombreux symptômes d'intoxication provoqués par l'exposition à la T2 ou à l'aurofusarine chez la volaille (Dvorska et al., 2007, Dvorska et al., 2003, Dvorska and Surai, 2001, Girish

and Devegowda, 2006) et chez le porc (Meissonnier, 2009). L'ajout de Mycosorb permet de limiter les effets toxiques des fusariotoxines en mélange (DON, acetyldeoxynevalenol (ADON), ZEN, acide fusarique (FA)). Les effets bénéfiques sont variés et observés sur la réponse lympho-proliférative stimulée par inoculation d'agents infectieux viraux et parasitaires chez le poulet (Girgis et al., 2008, Yegani et al., 2006). Chez la dinde, l'adsorbant empêche l'augmentation du poids de la bourse de Fabricius et l'inhibition de la réaction d'hypersensibilité cutanée (Girish et al., 2008).

A la différence des espèces monogastriques, très peu d'études ont été menées pour évaluer l'efficacité du Mycosorb chez le ruminant. Aucune étude n'a été réalisée pour mesurer ses effets sur la biodisponibilité des ochratoxines. Les effets bénéfiques du produit n'ont été rapportés que chez la vache en lactation exposée aux fusariotoxines (Korosteleva et al., 2007) et aux aflatoxines (Diaz et al., 2004). Les mesures effectuées par Korosteleva et al., (2007) montrent que l'addition de Mycosorb permet de retrouver un niveau de concentration normal en urée, sodium, protéines totales plasmatiques. Celles de Diaz et al., (2004) indiquent que les quantités d'AFM1 transférées dans le lait sont fortement réduites par l'ajout de la paroi de levure.

Les résultats de ces études *in vivo* suggèrent la stabilité des complexes [parois de levure-mycotoxines] dans le tractus digestif de l'animal mais doivent néanmoins être validés par d'autres études *in vivo* permettant d'évaluer la capacité réelle de cet adsorbant organique à diminuer la biodisponibilité des aflatoxines et des ochratoxines. C'est l'un des objectifs de mon travail de thèse.

### **3. Evaluation de l'efficacité de détoxification des agents adsorbants**

#### **a. Etudes in vitro**

Ces études réalisées en solution tamponnée ont pour but d'avoir une réponse rapide sur la capacité de l'adsorbant à fixer les mycotoxines. Elles sont utiles pour le criblage de plusieurs adsorbants ou pour déterminer les conditions optimales de séquestration, notamment en termes de pH. Les approches ont également été utilisées pour élucider les mécanismes d'adsorption des parois, démontrant le rôle des  $\beta$ -D-glucanes des levures (Yiannikouris et al., 2003) et du peptidoglycane des bactéries fermentaires (Niderkorn et al., 2009).

Cependant la mise en évidence *in vitro* de l'adsorption d'une mycotoxine ne constitue pas à elle seule une preuve de l'efficacité d'un adsorbant chez l'animal. Les conditions *in vitro* simulant par exemple celles du TGI ne sont pas comparables: l'absence de péristaltisme, les sécrétions salivaires et les sucs biliaires peuvent modifier l'efficacité de l'adsorbant d'où la nécessité de valider les résultats *in vitro* par des études chez l'animal.

## **b. Etudes in vivo**

L'efficacité de détoxification d'un agent adsorbant de mycotoxines est définie par sa capacité à se lier aux mycotoxines empêchant leur absorption gastro-intestinale et réduisant ainsi les effets toxiques chez l'animal (**Figure 10**). Elle peut être évaluée de 2 manières différentes : (1) soit sur la base de critères non spécifiques, c'est-à-dire par la mesure des performances ou des effets toxiques sur l'animal (**Encadré 1**), (2) soit la base de critères spécifiques, c'est à dire la mise en évidence de la mycotoxine ou de ses métabolites dans les différentes matrices.

### ***i. L'évaluation par les critères non spécifiques***

La majorité des travaux sur l'efficacité des agents de détoxification sont basés sur la mesure de ces critères avant et après exposition. Il s'agit de mesurer les paramètres globaux non sensibles comme les performances animales et la toxicité générale mais ces évaluations n'apportent pas la preuve formelle d'un lien entre la capacité de séquestration et la détoxification. Les bénéfices relevés peuvent être attribués à l'interaction de l'agent adsorbant avec les mycotoxines mais aussi à ses effets secondaires associés. En effet, certains composés pariétaux de levure comme les  $\beta$ -D-glucanes sont doués de propriétés anti-oxydantes (Jaehrig et al., 2008), ou prébiotiques par les mannanoligosaccharides (Baurhoo et al., 2009, Bruemmer et al., 2010) ou encore immunomodulatrices (Volman et al., 2008) et, pourraient donc entraîner une diminution des effets toxiques des mycotoxines sans que leur biodisponibilité ne soit significativement modifiée.

C'est pour cette raison que les évaluations basées sur des critères non spécifiques font appel à des protocoles incluant un lot avec les agents adsorbants en absence de mycotoxines. Dans ces études, les mesures sont réalisées sur quatre groupes d'animaux recevant:

- Une alimentation non contaminée
- Une alimentation non contaminée avec agent adsorbant
- Une alimentation contaminée sans agent adsorbant
- Une alimentation contaminée avec agent adsorbant.

### **i.1 Les mesures des performances animales**

Il est possible de tenir compte des performances de l'animal pour évaluer l'efficacité d'un adsorbant du fait que ces paramètres peuvent être modifiés en cas de stress chronique provoqué par l'ingestion de mycotoxines.

Les éleveurs et les industriels s'appuient généralement sur de bons résultats zootechniques pour conclure à l'efficacité d'un adsorbant, mais les faits peuvent parfois les contredire. Les données de la littérature montrent souvent que ces paramètres ne sont pas répétables. Par exemple, l'addition de parois de levures dans la ration contaminée en aflatoxines (2 ppb) améliore significativement le poids et la conversion alimentaire chez le poulet (Girish and Devegowda, 2006). En revanche, d'autres études utilisant des doses moins importantes d'AFB1 (0.184 ppb) ne montrent aucun effet par l'analyse des mêmes paramètres zootechniques (Kamalzadeh et al., 2009). Des observations similaires ont été faites chez le poulet exposé à la T2 (Diaz et al., 2005, Girish and Devegowda, 2006), chez le porc contaminés par du DON (Diaz-Llano and Smith, 2006, 2007) ou chez le cheval recevant un mélange de fusariotoxines (DON+ADON+ZEN+FA) (Raymond et al., 2003, 2005).

L'évaluation de l'efficacité des adsorbants par la mise en évidence des effets zootechniques reste imprécise même lorsque les animaux ingèrent de l'aliment fortement contaminé. Pour réduire les performances de production du vison, Bursian et col., (2004) ont utilisé des concentrations de mycotoxines supérieures à celles qu'on retrouve dans les aliments contaminés naturellement. Dans cette étude, aucun effet négatif n'a pu être observé sur les animaux exposés à de la moniliformine (20 ppb), de la ZEN (30 ppb), ou des FB (300 ppb). Seule l'administration d'ochratoxines à 2.5-10 mg/kg d'aliment entraîne une diminution des quantités ingérées conduisant jusqu'à 23% de perte de poids vif des animaux après 8 jours d'exposition. L'ajout de parois de levures à 0.2% dans la ration est inefficace à ce niveau de contamination et n'empêche pas la baisse des performances zootechniques.

L'étude des paramètres zootechniques conduit généralement à l'absence de conclusions sur l'efficacité des adsorbants chez le ruminant (Korosteleva et al., 2007). Les critères de performance de production laitière (volume et qualité du lait) ne permettent pas d'évaluer l'efficacité des parois de levures vis-à-vis des aflatoxines chez le bovin (Kutz et al., 2009, Waltman, 2008). Seule la baisse de la consommation d'aliment a pu être rapportée par Stroud et al., (2006) chez la vache laitière recevant une dose quotidienne de 0.17 ppb d'AFB1. Dans cette étude, l'ajout de parois de levures à 0.5% dans la ration ne modifie pas le comportement alimentaire de l'animal.

## **i.2 Mesure de la toxicité générale**

L'efficacité d'un adsorbant peut également être évaluée par l'étude de l'altération d'un organe ou la perturbation d'une ou plusieurs fonctions de l'organisme de l'animal exposé aux mycotoxines.

En pratique, les mesures toxicologiques, généralement combinées aux mesures zootechniques, ne sont pas plus pertinentes pour juger de l'efficacité d'un adsorbant, celle-ci pouvant varier de façon importante d'un paramètre toxicologique à l'autre. Par exemple, l'administration de parois de levures entraîne des effets bénéfiques au niveau histologique et immunologique chez le poulet exposé à de l'aliment contaminé par de l'aflatoxine (Banlunara et al., 2005, Girish and Devegowda, 2006, Karaman et al., 2005) mais n'est pas suffisant pour freiner la déplétion en anti-oxydants plasmatiques (vitamines, carotènes) et la peroxydation lipidique des erythrocytes dans des conditions d'expositions similaires (Cinar et al., 2008).

Les effets de l'adsorbant ne sont pas toujours reproductibles. L'analyse histologique de l'intestin grêle chez la dinde exposée à des fusariotoxines révèle que les effets de parois de levure sur la réduction des altérations morphologiques du duodénum sont observés chez l'animal en croissance mais pas au stade de l'engraissement (Girish and Smith, 2008).

Les effets observés sur un même individu sont généralement limités à quelques paramètres. Il apparaît dans la quasi-totalité des travaux que de nombreux signes d'intoxication subsistent chez les animaux traités avec l'agent adsorbant (Girish and Smith, 2008, Girish et al., 2008). A titre d'exemple, l'addition de parois de levures peut agir sur le profil d'expression de certains neurotransmetteurs de l'hypothalamus chez poulet ou du cortex et du pont de Varole chez le porc mais sans intervenir sur les changements opérant dans d'autres régions de leur cerveau (Swamy et al., 2004; Swamy et al., 2002). Cette

hétérogénéité des résultats rend souvent les comparatifs des bilans toxicologiques difficilement exploitables et nuance la notion d'efficacité pour chaque espèce aviaire, porcine ou ruminante.

Les paramètres toxicologiques ne sont pas sensibles aux doses d'exposition compatibles avec les niveaux de contamination naturels de l'alimentation animale. Il est souvent nécessaire d'analyser un nombre important de variables pour mettre en évidence les effets d'un adsorbant sur la santé animale (Swamy et al., 2002, Swamy et al., 2003). Dans certains cas, l'exposition prolongée à de faibles doses de mycotoxines n'entraîne aucune conséquence sanitaire et rend impossible l'évaluation de l'efficacité du traitement adsorbant (Battacone et al., 2007). Chez le modèle ruminant, les manifestations cliniques ne sont pas observées (Martin et al., 2010), même à des doses importantes du fait de la résistance de ces animaux à la toxicité des mycotoxines. A notre connaissance, aucune étude toxicologique n'a permis d'apporter la preuve de l'efficacité des adsorbants organiques lors d'une exposition aux aflatoxines et aux ochratoxines chez le ruminant. L'unique travail publié concerne la vache laitière recevant simultanément de faibles doses de DON, d'ADON et de ZEN (Korosteleva et al., 2007).

*Malgré la richesse et l'abondance de la littérature scientifique, l'évaluation par les paramètres non spécifiques reste limitée pour caractériser l'efficacité des agents adsorbants de mycotoxines in vivo du fait que cette approche est peu précise et peu fiable. Pour connaître la capacité réelle d'un adsorbant à réduire la biodisponibilité d'une mycotoxine dans l'organisme animal, il est indispensable de préciser son efficacité par la mesure de critères plus spécifiques.*

## ***ii L'évaluation par les critères spécifiques***

A la différence de l'approche zootechnique ou toxicologique, l'évaluation par les critères spécifiques permet d'étudier le devenir de la mycotoxine et/ou de ses métabolites dans les différentes matrices biologiques. L'évaluation de l'efficacité des agents adsorbants est généralement mesurée en comparant l'excrétion fécale et urinaire.

L'analyse simultanée de l'urine et des fèces est le critère d'évaluation spécifique le plus pertinent. Il donne une indication sur la quantité de mycotoxines absorbée dans l'organisme et celle fixée par l'adsorbant et éliminée dans les fèces.

L'étude d'excrétion peut être complétée par la mesure des paramètres toxicocinétiques au niveau sanguin notamment la concentration maximale ( $C_{max}$ ) et l'aire sous la courbe (AUC) (**Figure 11**) qui permet de caractériser plus spécifiquement l'effet de l'adsorbant sur l'absorption des mycotoxines.

Pour les ruminants laitiers, l'efficacité est principalement évaluée par le transfert des mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans le lait. Le transfert dans le lait se mesure à l'équilibre des concentrations (EC) (**Figure 12**). Cet état d'équilibre ou phase plateau désigne le taux maximal et constant que peut excréter l'animal en lactation suite à une administration répétée de mycotoxines à intervalles réguliers. Par exemple, l'EC de l'AFM1 dans le lait apparaît entre 3 et 9 jours d'exposition à de l'AFB1 selon les modèles expérimentaux (Battacone et al., 2003).

A ce jour, peu de données sont disponibles concernant les évaluations de l'efficacité des agents adsorbants organiques par les critères spécifiques. La principale raison est le coût économique de ce type d'expérimentation. La quasi-totalité des études sur ruminants a porté sur le transfert d'AFM1 dans le lait de bovins de race laitière (**Tableau 9**). Les évaluations ont été conduites essentiellement sur les parois de levures à des doses d'exposition d'AFB1 variant de 0.00345 ppb à 0.17 ppb. Dans ces essais, le taux d'AFM1 excrété dans le lait des animaux exposés à des doses supérieures à 0.1 ppb d'AFB1 reste inchangé lorsque la paroi de levure est administrée à une forte concentration dans la ration (0.5%) (Kutz et al., 2009, Stroud, 2006). En revanche, les études utilisant des doses d'aflatoxines proches des teneurs réglementaires (<0.055 ppb d'AFB1) montrent que l'addition des parois de levures à des concentrations utilisables dans l'alimentation animale (0.05%) réduit jusqu'à 58.5% le taux d'AFM1 excrété dans le lait (Diaz et al., 2004; Masoero et al., 2007).

Aucune des évaluations menée sur les parois de levures n'a été réalisée en utilisant la mesure de la balance d'excrétion des mycotoxines (fèces vs urine). Les seules mesures réalisées concernent le suivi des mycotoxines dans la circulation générale et les organes sur des espèces animales monogastriques (Meissonnier, 2009, Zaghini et al., 2005b). Dans ces études, la comparaison du taux d'OTA dans le plasma, le foie et le muscle de poulet ou du taux d'adduits d'AFB-albumine plasmatique chez le porc n'ont conclu à aucune efficacité des parois de levure.

*L'utilisation des adsorbants organiques pourrait être potentiellement adaptée à la détoxification de l'alimentation du ruminant. Cependant, les études réalisées jusqu'à présent pour évaluer l'efficacité de ces produits sont insuffisantes pour justifier une application en alimentation animale. D'autres mesures, telles que les paramètres toxicocinétiques sanguins et la balance d'excrétion urinaire et fécale sont nécessaires afin de confirmer la réduction de la biodisponibilité des aflatoxines et des ochratoxines dans l'organisme animal.*

## **PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE**

La présence des mycotoxines dans les productions végétales constitue un problème de qualité et de sécurité alimentaire. Pour cette raison, les pays de l'union européenne ont adopté une réglementation commune fixant les teneurs maximales en aflatoxines et en ochratoxines dans l'alimentation animale et instauré des contrôles stricts afin d'abaisser les niveaux de contamination des aliments commercialisés et de limiter l'importation de denrées contaminées. Cependant, l'alimentation du bétail est également composée d'aliments non commercialisés, ce qui est souvent le cas pour les ruminants laitiers. Ces denrées, généralement produites et consommées à la ferme, échappent à la réglementation européenne et aux contrôles et présentent un risque potentiel de contamination par les mycotoxines (EFSA, 2004a).

La complexité du régime alimentaire est un facteur aggravant le risque d'exposition du ruminant. Les données disponibles montrent que certains lots d'aliments industriels (concentrés, compléments alimentaires) peuvent contenir des taux élevés de mycotoxines (Sacca et al., 2009). Le maïs et les ensilages de maïs, qui constituent une part importante de la ration du ruminant laitier, présentent un risque supplémentaire d'apport de mycotoxines (Giorni et al., 2007). L'alimentation du ruminant inclus également d'autres ingrédients à base de fourrages, des farines de protéines, de co-produits qui augmentent la probabilité d'exposition par plusieurs mycotoxines (Boudra et al., 2009, Morgavi et al., 2008).

Les aflatoxines et les ochratoxines peuvent être potentiellement présentes dans l'alimentation du ruminant à des teneurs variables selon la composition et la provenance des ingrédients de sa ration. Les conséquences économiques de ces contaminations, peuvent être dues à une diminution des performances animales mais également à différents coûts supplémentaires (achats de compléments alimentaires, soins vétérinaires). La présence d'aflatoxines et d'ochratoxines dans la ration peut également avoir des conséquences sanitaires chez le ruminant à cause des effets de l'ingestion répétée des mycotoxines lors de multi-contamination. De plus, la contamination de la production laitière, même à de très faibles teneurs, présente un risque pour la sécurité alimentaire du consommateur qui ne doit pas être négligé. Les impacts économiques et sanitaires engendrés par les mycotoxines, à court ou à long terme sont difficilement mesurables mais suffisamment préoccupants pour justifier l'emploi de méthodes de prévention et de détoxification aux différentes étapes de l'élaboration des aliments destinés aux ruminants.

Le respect de bonnes pratiques de cultures et de conservation par le fermier permet d'abaisser et de maintenir la contamination des productions végétales à des niveaux faibles. Cependant, ces efforts de prévention ont des limites et sont insuffisants pour éliminer totalement les mycotoxines de l'alimentation animale.

Pour limiter les risques d'exposition du ruminant par son alimentation, il est nécessaire de disposer de moyens de détoxification capables de neutraliser les mycotoxines présentes à de faibles teneurs dans la ration et applicables quelque soit le régime alimentaire de l'animal. L'ajout d'adsorbants minéraux dans l'alimentation du ruminant est une méthode déjà employée dans ce but. Les propriétés d'adsorption de ces composés permettent de retenir les mycotoxines dans le TGI des animaux et de réduire leurs effets sur l'organisme. Cependant, leur usage n'est envisageable que pour la détoxification des aflatoxines. Les adsorbants minéraux sont peu efficaces vis-à-vis des autres mycotoxines, notamment l'OTA (Kabak et al., 2006). Par ailleurs, ce sont des adsorbants non spécifiques. L'ingestion par l'animal peut entraîner la diminution de l'absorption digestive de micronutriments, comme les vitamines, les minéraux et les acides aminés essentiels et conduire à des effets de carences sur le long terme (Huwig et al, 2001).

Les recherches actuelles tendent à privilégier les stratégies plus douces utilisant les propriétés biologiques des microorganismes pour la détoxification de l'alimentation des animaux d'élevage. Ces agents organiques, notamment les bactéries et les levures, peuvent dégrader ou séquestrer plusieurs mycotoxines en conditions *in vitro*. Par ailleurs, ils présentent moins d'inconvénients que les autres procédés en raison de leur faible taux d'inclusion dans l'aliment. De plus, le traitement de l'alimentation animale par ces agents organiques peut avoir des effets bénéfiques sur les performances zootechniques comme la digestion (Chaucheyras-Durand et al., 2008) et le bien être en modulant l'acidose (Chung et al., 2011) et en stimulant le système immunitaire de l'animal (Volman et al., 2008). Les agents organiques apportent également d'autres bénéfices et peuvent être utilisés comme des conservateurs de l'aliment (Dicks and Botes, 2010, Holzer et al., 2003) ou des inhibiteurs de la croissance des moisissures toxigènes (Munoz et al., 2011).

La méthode la plus prometteuse pour la détoxification de l'alimentation du ruminant est celle qui fait appel aux adsorbants organiques comme les extraits de parois de levures. Leur application dans la ration alimentaire apparaît comme une alternative efficace aux adsorbants

minéraux. La capacité de séquestration d'une large gamme de mycotoxines, les aflatoxines, les ochratoxines et les fusariotoxines rend l'utilisation des adsorbants organiques souhaitable dans les conditions d'alimentation des ruminants où la contamination par plusieurs mycotoxines est fréquente (Boudra et al., 2009).

Bien que quelques produits commencent à apparaître sur le marché, la plupart des adsorbants organiques sont en développement et n'ont été évalués que par des études *in vitro* qui ne reflètent pas toujours l'efficacité *in vivo* des produits testés. D'autre part, la quasi-totalité des évaluations *in vivo* portant sur l'efficacité des adsorbants organiques font appel notamment aux mesures de la production animale et de la toxicité générale. La mesure de ces paramètres présente de nombreux inconvénients du fait qu'ils ne sont ni spécifiques, ni sensibles même à des doses importantes. Ces paramètres ne permettent généralement pas de conclure à l'efficacité des adsorbants organiques contre les principales mycotoxines chez le ruminant, en particulier celles qui sont fortement dégradées par le microbiote du rumen comme l'OTA. Pour évaluer l'efficacité d'un adsorbant de façon spécifique chez le ruminant, il est nécessaire de doser et de suivre les mycotoxines dans les différentes matrices biologiques de l'animal.

Très peu d'information est disponible sur la manière dont les adsorbants organiques peuvent modifier les paramètres toxicocinétiques et l'excrétion des mycotoxines chez le ruminant laitier. Aucune évaluation n'a été réalisée par un suivi complet des mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans les différentes matrices biologiques. La majeure partie des travaux chez le ruminant a été focalisée sur le transfert dans le lait. Ces études ne concernent que certaines mycotoxines ou leurs métabolites pouvant être excrétés dans la matrice comme l'AFM1. L'efficacité des adsorbants organiques n'a jamais été démontrée chez le ruminant par la comparaison des profils d'excrétion fécale et urinaire de l'AFB1. Les études réalisées jusqu'à présent ne permettent pas de savoir si les agents organiques testés sont réellement capables de séquestrer les mycotoxines dans le TGI des animaux, en particulier chez le ruminant.

En Europe, l'emploi d'additifs pour la détoxification des mycotoxines en alimentation animale est soumis depuis le 12 mai 2009 à une réglementation qui ne reconnaît que les composés ayant démontré '*une capacité à réduire ou supprimer l'absorption, promouvoir l'excrétion des mycotoxines ou modifier leur mode d'action*' (Directive 386/2009/CE). Face à

une législation plus contraignante et les enjeux associés à l'application des additifs en alimentation animale, il est important de mieux caractériser les effets des agents adsorbants organiques sur la biodisponibilité des mycotoxines chez les animaux d'élevage.

L'objectif de mon travail de thèse est d'évaluer l'efficacité d'un adsorbant à base de parois de levure à réduire la biodisponibilité de l'aflatoxine B1 chez le ruminant.

Mais avant d'envisager une étude chez un modèle animal d'élevage, il était nécessaire de valider *in vivo* chez le rat les résultats des études menées sur la séquestration des mycotoxines par cet adsorbant. Des essais préliminaires ont été réalisés à faibles doses de mycotoxines compatibles avec les teneurs retrouvées dans l'alimentation des animaux d'élevage. Ces essais ont consistés à mettre en place un test chez le rat permettant de suivre la distribution de l'AFB1 et de l'OTA dans la circulation générale (sang / plasma) et les différentes voies d'excrétion (urine et fèces) par un marquage radioactif. L'administration de toxines radiomarquées permet de quantifier les toxines dans les matrices en un temps limité en s'affranchissant des méthodes analytiques classiques trop lourdes à mettre en place. Ce travail a bénéficié de l'expertise du laboratoire Cinétique des Xénobiotiques de la faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse, France avec la participation du Pr. G. Houin et du Dr. P. Gandia pour la mise en œuvre de l'étude sur le modèle rongeur et le dosage des mycotoxines dans les matrices selon des techniques radiochimiques.

Une fois la preuve du concept obtenue chez le rat, une validation a été réalisée en utilisant la brebis laitière comme modèle expérimental. Pour cet essai, seule l'AFB1 a été choisie comme mycotoxine d'étude. Les effets de l'adsorbant ont été étudiés en comparant les profils d'excrétion de l'AFB1 et de son métabolite l'AFM1 dans l'urine, les fèces, le lait du ruminant à la suite d'une exposition répétée à de l'aliment contaminé. L'essai sur le modèle brebis a nécessité de nombreuses mises aux points et la validation des méthodes de dosage des aflatoxines dans les différentes matrices biologiques par des techniques de chromatographie liquide haute performance (CLHP).

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

**I. EVALUATION DE L'EFFET D'UNE PREPARATION DE PAROIS DE LEVURE SUR L'ABSORPTION GASTRO-INTESTINALE DE L'AFB1 ET DE L'OTA CHEZ LE RAT**

*Publication-Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation-Food Additives and Contaminants, Vol. 27, No. 8, August 2010, 1153–1160.*

**RESEARCH ARTICLE**

**Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation**

S. FIRMIN<sup>a,b</sup>, P. GANDIA<sup>c</sup>, D.P. MORGAVI<sup>a</sup>, G. HOUIN<sup>c</sup>, J.P. JOUANY<sup>a</sup>, G. BERTIN<sup>b</sup> and H. BOUDRA<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>INRA, UR1213, Unité de recherches sur les Herbivores, Centre de Clermont-Theix, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France ; <sup>b</sup>Alltech-France, European Regulatory Department, F-92593 Levallois-Perret, France ; <sup>c</sup>Laboratoire Cinétiques des Xénobiotiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier Toulouse 3, Toulouse 31062 cedex 9, France

(Received 06 April 2009, final version received 22 March 2010)

**Abstract**

The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* can bind mycotoxins in vitro but there is scarce information on whether this property decreases the absorption of mycotoxins in vivo. The effect of a yeast cell wall preparation (YCW) on toxicokinetics and balance excretion (urine and faeces) of aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) was tested in rats after oral administration of each toxin. The <sup>3</sup>H-labelled mycotoxins were used at low doses. Co-administration of YCW with AFB1 decreased the extent but not the rate of absorption. Concurrently, radioactivity excreted in faeces increased by up to 55% when compared to controls, whilst the excretion in urine decreased ( $p < 0.05$ ). The effect of YCW on OTA was less marked, although it increased radioactivity excretion in faeces (up to 16%;  $p < 0.05$ ) it did not result in changes in urine and toxicokinetic parameters. The in vivo effect is in agreement with the reported in vitro binding ability for these toxins (AFB1 > OTA). In conclusion, these results indicate that YCW could be used to protect monogastric animals against exposure to low dietary levels of selected mycotoxins.

**Keywords:** aflatoxin B1; ochratoxin A; yeast cell wall; detoxification; adsorbing agent; toxicokinetics; rat

## **Introduction**

Mycotoxins are secondary fungal metabolites commonly found in foods and feeds (Placinta et al. 1999; Garon et al. 2006; Binder et al. 2007). Many of these secondary metabolites are toxic to humans and animals, affecting health, reducing animal performance and causing substantial economic losses. The application of good agricultural and storage practices can reduce contamination but some factors contributing to fungal development, such as climatic conditions, are beyond human control and the absence of mycotoxins in the ration of farm animals cannot be fully assured. Presence of mycotoxins in feeds is of concern in livestock production as it poses a risk for animals and also for consumers if toxic molecules are transferred into animal products. In most countries contamination levels of aflatoxin B1 (AFB1) in feeds are regulated and thus, highly-contaminated feeds are not normally given to animals. However, contamination levels just below the legal limit may still have a negative, long-term impact on production. In addition, on-farm produced feeds are seldom controlled, which may result in higher than tolerable mycotoxin ingestion.

Several methods have been investigated for their capacity to remove, or reduce, mycotoxins in contaminated feeds (reviewed by Jouany 2007). Some physical and chemical treatments such as the use of ammonia are expensive or simply not adapted to the treatment of feeds destined for livestock (Niderkorn et al. 2007). The use of products, which could be defined as mycotoxins inactivators, to reduce absorption of mycotoxins in the gastrointestinal tract of animals, is one such practical alternative which is currently receiving increased attention. Among these products, organic adsorbents such as yeast cell wall (YCW) have been shown to rapidly form complexes in vitro with mycotoxins (Devegowda et al. 1998). Feeds multicontaminated by mycotoxins are frequent in the field (Scudamore et al. 1998; Mansfield et al. 2008) and the ability of YCW to bind several mycotoxins makes them suitable for use under practical feeding conditions. In vivo studies have shown that YCW can reduce the adverse effects of mycotoxins in different animal species; swine (Swamy et al. 2002), horse (Raymond et al. 2003), laying hens (Chowdhury et al. 2005), and dairy cows (Korosteleva et al. 2007). In these studies the detoxification efficiency of YCW has been mainly evaluated on the basis of animal performance and/or the absence of toxicity, but the precise mechanism responsible for the beneficial effect of this additive has not yet been clearly demonstrated. In lactating dairy cows receiving AFB1, a decrease in the excretion of aflatoxin M1 in milk was observed in some studies (Diaz et al. 2004; Masoero et al. 2007) but

not in others (Stroud 2006; Waltman 2008; Kutz et al. 2009). A decrease in milk carryover suggests that mycotoxin absorption was impaired.

The purpose of this study was to evaluate the effect of a YCW-based preparation on AFB1 and ochratoxin A (OTA) toxicokinetics in rats. AFB1 and OTA were chosen as they are the two most common mycotoxins found in feeds and which can cause a variety of toxic responses in animals, including nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic, and carcinogenic effects. Mycotoxins were <sup>3</sup>H-labelled and radioactivity was monitored in faeces, urine and plasma following oral administration. The YCW product was tested at two different doses and mycotoxins were used at relatively low concentrations and in a single dose (< 1% LD50) to prevent overt perturbations of liver and kidney functions.

## **Materials and Methods**

### ***Chemicals***

Non radioactive AFB1 and pentobarbital sodium were purchased from Sigma Chemical (St Quentin, France). [<sup>3</sup>H]-AFB1 (two different lots were used with a specific activity of 6.9 and 17.5 Ci/mmol; 97% and 98.6% purity) and [<sup>3</sup>H]-OTA (specific activity: 5 Ci/mmol; 99.6% purity) were supplied by Hartmann Analytic (GmbH, Braunschweig, Germany) in methanol and ethanol solutions, respectively. A stock solution of non radiolabelled AFB1 was prepared in methanol at a concentration of 0.2 mg/mL. Ready Safe™ LSC cocktail was supplied by Beckman Coulter (Villepinte, France), soluene-350® by Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). A preparation composed of modified cell walls extracts of *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026 was provided by Alltech Inc. (Yeast Cell Wall (YCW), purity 90%, batch No FR71535-1, Nicholasville, U.S.A.). YCW was used as a suspension in 0.9% NaCl at a concentration of 20 mg/ml. Suspensions were freshly prepared before use.

### ***Animals and administration of mycotoxin***

Eight week-old male Sprague-Dawley (265 ± 30 g) rats were purchased from Depré Centre (Saint-Doulchard, France). Rats had free access to water and were fed *ad libitum* with certified 2016 Teklad Global 16% Protein Rodent Diet (Harlan Inc, WI, U.S.A.). The animal room was environmentally controlled, animals were provided with 12 hours light each day with the temperature range maintained between 22 to 25 °C, and a relative humidity range of 40-55%. Studies were conducted in accordance with the applicable national and European

guidelines and regulations for experimentation with animals (see [http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc\\_regl.html](http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html) for details).

Mycotoxins were administered by gavage through a gastric intubation at a constant volume of 2 ml of a dose solution per kg of BW. The exact amount administered was determined by weighing the dosing syringe before and after gavage. Feed was removed from cages 12 h before gavage and rats were fed again 6 h post gavage. The dose solution contained AFB1 or OTA (specific activity: 40  $\mu$ Ci/kg of BW) with or without YCW at one of two concentrations. Stock mycotoxin solutions were diluted to the desired dose volume with 0.9% NaCl and 0.1M NaHCO<sub>3</sub> for AFB1 and OTA, respectively. For the high dose of AFB1 (18.12  $\mu$ g/kg BW) a 10-fold isotopic dilution was prepared by co-diluting [<sup>3</sup>H]-AFB1 (specific activity: 6.9 Ci/mmol) with non radiolabelled AFB1. The YCW suspension was replaced by a solution of 0.9% NaCl in control animals.

### ***Study design***

The protocol design is presented in figure 1. A first assay using AFB1 was performed to optimize the protocol. In this trial a comparison between the use of blood and plasma samples for monitoring absorption was made. Radioactivity in urine and faeces was monitored for up to 15 days to evaluate the minimum collection time necessary to correctly assess excretion. Two groups of rats were included, each group was made up of 3 lots that received a single dose of AFB1 (40  $\mu$ Ci and 18.12  $\mu$ g/kg BW) alone (lot 1) or in combination with YCW at 4 mg/kg BW (lot 2) and 10 mg/kg BW (lot 3). In group 1, 12 rats (3 per lot) were randomly and individually placed in metabolism cages (U.A.R., Epinay sur Orge, France). Urine and faeces were collected at 6, 12, 24, 36 and 48 h, and then every 24 h up to 15 days post dose. Following each collection cages were meticulously rinsed with water/methanol solution (1/1; v/v) and washing solutions collected in order to evaluate possible loss of radioactivity due to urine remaining within the cages. Each sample (urine, faeces and recovered washings) were weighed and stored at - 20° C until analysis. Animals were sacrificed by cervical dislocation following the last collection of excreta. Liver, kidneys, jejunum, ileum and caecum of six animals (3 rats control and 3 rats YCW low dose) were dissected, weighed and aliquots were stored at -20 °C until analysis. Intestinal segments were processed without their contents. After sampling, viscera from each animal were regrouped with the carcass, homogenized and analyzed for total body radioactivity.

In group 2 (n=117; 39 rats per lot) 3 rats were taken at each time point and anaesthetised by an intraperitoneal injection of 50 mg/kg BW sodium pentobarbital. Blood (approximately 3 mL) was collected using the vacutainer<sup>®</sup> system (Beckson Dickinson) into heparinized tubes (Beckson Dickinson) by ex-sanguination from the abdominal aortic vein at 0 (no toxin), 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 24, 36, 48 and 72 h post dose. After sampling rats were euthanized. An aliquot of blood was immediately used for analysis as described below. The remaining blood sample was centrifuged (1000 × g, 5 min at 4 °C) and the plasma fraction decanted into clean tubes and stored at – 20 °C until analysis.

Based on this first study with AFB1 a good correlation between plasma and blood samples was established, only plasma samples were collected on the second AFB1 and OTA studies. In addition, in the second study urine and faeces were collected for three days, as the bulk of the radioactivity was recovered within the first 72 h post dosing.

The second AFB1 experiment was conducted using a lower dose (0.716 µg/kg BW), which was provided by [<sup>3</sup>H]-AFB1 alone (specific activity: 17.5 Ci/mmol). This dose, when extrapolated to livestock species is in line with the European Community limitation of 0.02 mg/kg feed (directive 2003/100/EC). In a similar way, doses of AFB1 were administered alone (lot 4) or in combination of YCW at doses of 16.4 (lot 5) and 65.7 mg/kg BW (lot 6), which were within the range recommended by the YCW manufacturer for different livestock species when calculated based on their inclusion in feed. For the excretion study, 15 rats were used (5 per lot) and urine and faeces were collected at 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h post dosing. For the absorption study (n=117; 39 rats per lot), plasma was obtained and stored as described above at 0 (no toxin), 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 24, 36, 48 and 72 h post dose.

The OTA study was similar to the second AFB1 study with 15 (5 per lot) and 63 rats (21 per lot) used for excretion and plasma measurements, respectively. Urine was collected for 3 days and faeces for 10 days. OTA was administered at a dose of 3.22 µg/kg BW for a total radioactivity of 40 µCi per rat alone (lot 7) or in combination with YCW at 16.4 (lot 8) and 65.7 mg/kg BW (lot 9).

### ***Sample preparation and analysis***

Before analysis faecal samples were homogenized in distilled water, 10% (w/w) dilution. Faecal homogenates (50 mg) were incubated at 50 °C overnight with 1 ml of soluene<sup>®</sup>-isopropanol solution (1/1; v/v) and 0.5 ml of 30% hydrogen peroxide. Blood samples (50 µl) were treated as faecal samples but were processed immediately after collection in order to

minimize non-radioactive scintillation counting. All samples, i.e. blood, faecal homogenate, urine (100 µl), plasma (100 µl), and wash water from metabolic cages were mixed with 10 ml of Ready Safe™ scintillation fluid and stabilized overnight in the dark before counting the radioactivity in a LS 1801 scintillation counter (Beckman Coulter, Villepinte, France). All samples were analyzed in triplicate, except for blood samples that were analyzed in duplicate.

Tissue radioactivity was measured by liquid scintillation counting after oxidative combustion with an oxidizer (Packard 306 Oxidizer, Packard Instruments, Meridien, CT, USA), using Permafluor E+ MonophaseS® (Packard Instruments) as the scintillation cocktail. Viscera and carcass samples (200 mg) were packed into cellulose combustion cones imbibed with 100 µl of an organic-based combustion aid solution Combustaid® (Packard Instruments) and were analyzed in triplicate and quadruplicate, respectively.

### ***Toxicokinetics and statistical data analysis***

Non-compartmental methods were used to estimate the toxicokinetic parameters of radiolabelled mycotoxins. The parameters  $C_{max}$  and  $T_{max}$  were observed values defined as the highest concentration achieved and the required time to achieve it, respectively.  $AUC_{0-last}$  was the area under plasma concentration versus time curve, calculated by the trapezoidal method between the first and the last measurable concentration.  $AUC_{0-\infty}$  was the  $AUC_{0-last}$  extrapolated to infinity by the ratio of the last measurable concentration to the terminal slope  $k_e$ . Elimination constant ( $k_e$ ) was determined by using the Kinetica software (InnaPhase, Champ-sur-Marne, France, release 4.0).  $T_{1/2}$  corresponds to the terminal half-life determined as the ratio of Neperian logarithm of 2 to the terminal slope ( $k_e$ ). Due to the experimental design, it was not possible to conduct a statistical analysis directly on the kinetic parameters (Lellouch, Lazar 1996). Samples for toxicokinetic parameters calculation were obtained from three different rats at each sampling time. Radioactivity values measured in plasma and blood were compared at each sampling time using non-parametric, one-way-analysis of variance (Kruskal-Wallis test) using SAS version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC). The Kruskal-Wallis test was also used to analyse excretion data (urine and faeces). Significance was declared at the 5% probability level.

### **Results**

No overt toxic effects, sickness or behavioural anomalies were observed in any animals in any of the studies. In the first AFB1 study radioactivity values for plasma samples were

about half that of blood, but profiles were similar between both matrices (data not shown). Although the recovery was lower with plasma, this matrix was used in subsequent studies because, unlike blood, plasma samples could be stored and analysed all at the same time. Radioactivity recovered in urine after 3 days and up to 15 days following the gavage was 1.3%, which did not represent a large proportion of the total. In faeces it represented a larger fraction of approximately 15%. In both cases, however, no differences were observed between treatments ( $p > 0.05$ ; data not shown), justifying the 72 h collection period of later studies following gavage administration.

Data from all three studies are presented in Tables 1 and 2, but results in the text for AFB1 refer to the low dose study unless otherwise stated. Toxicokinetic parameters are summarized in Table 1 with an example of plasma profiles for [<sup>3</sup>H]-AFB1 (Figure 2). Radioactivity from AFB1 was detected 1 h after dosing, reaching a maximum value at 4 to 5 h post dosing and decreasing slowly thereafter with an elimination half-life ( $T_{1/2}$ ) of about 64 h. The combination of YCW with [<sup>3</sup>H]-AFB1 altered plasma profiles, namely the absorption phase, irrespective of YCW dose. This decrease in the oral bioavailable fraction of AFB1 was not accompanied by modifications of the absorption rate.  $C_{\max}$  and AUC were lower in YCW treated lots when compared to values obtained in respective control groups. The average decrease of  $AUC_{0-\infty}$  after co-administration of YCW was approximately 38% and was independent of dose, except for high YCW at the high AFB1 concentration which resulted in a less marked decrease (Table 1). In contrast, the parameters of elimination phase ( $T_{1/2}$  and  $k_e$ ) were not influenced by YCW co-administration.

The excretion balance in the presence of YCW (Table 2) was in agreement with the changes observed in the plasma toxicokinetic parameters. Urinary excretion of radioactivity was lower after co-administration of YCW ( $p < 0.05$ ), while faecal excretion increased ( $p < 0.05$ ) (Table 2). Excretion in faeces increased by as much as 55% when compared to controls without YCW. The level of YCW inclusion did not have any effect on radioactivity excretion.

In the OTA study this toxin reached a higher maximum concentration than AFB1 in plasma, resulting in higher calculated AUC parameters (Table 1). In contrast, the YCW treatment showed a less perceptible effect during the absorption phase. In YCW treated animals OTA concentration in plasma was lower than control animals 1 h after gavage ( $p < 0.05$ ). However, beyond 1 h post-gavage OTA concentrations were the same in all three groups ( $p > 0.05$ ). Although the YCW treatment did not affect urinary excretion, it increased

toxin elimination in faeces ( $p < 0.05$ ; Table 2). However, this increase was less marked than AFB1, approximately 15% compared to 55% for the latter.

Metabolic cages were rinsed and the wash water counted to address the possibility that urine was not fully collected and a proportion of urinary radioactivity was unaccounted for. Cage contamination was 1.3%, 3.3% and 5.2% of the total radioactivity excreted for the low-AFB1, high-AFB1 and OTA experiments, respectively (Table 2). Whether these values were added to the urine radioactivity or not did not affect the results. The effect of YCW on the level of radioactivity accumulating in rats was assayed using animals from the first AFB1 experiment. At 15 days post-treatment the residual radioactivity in the carcasses of the control group was  $2.5\% \pm 0.68$  (mean  $\pm$  SD) compared to  $1.6\% \pm 0.41$  for the low YCW group ( $p = 0.12$ ). Trace amounts of radioactivity (0.005%) were found in kidneys and different segments of the gastrointestinal tract. The liver accounted for the bulk of viscera radioactivity with  $0.31\% \pm 0.034$  and  $0.19 \pm 0.082$  for control and YCW group, respectively ( $p < 0.05$ ).

## **Discussion**

Mycotoxin sequestration in the gastrointestinal tract by adsorbing agents such as yeast cell walls could be a promising strategy to protect against the toxic effect of these feed contaminants. However, there is still scarce information on their effect in vivo. Recent reports indicate a positive effect on animal production performance and a reduction of mycotoxin carryover into milk (Diaz et al. 2004; Chowdhury et al. 2005; Korosteleva et al. 2007; Masoero et al. 2007). In contrast, the use of these kind of additives do not always result in a positive effect on the parameter measured (Stroud 2006; Waltman 2008; Kutz et al. 2009). The type of yeast could be at the origin of these differences among studies. The cell wall polysaccharide responsible for mycotoxin binding such as the alkali insoluble fraction of  $\beta$ -D-glucans (Yiannikouris et al. 2004b) varies in quality and quantity between species and strains (Nguyen et al. 1998). In addition, it has been described that for a same strain the growth conditions and the preparation process influence the adsorption capacity of yeast cell wall additives (Pradelles et al. 2008). The inconsistency between studies, however, could also be due to other reasons such as the mode of incorporation of the preparation into the diet or by the type of feed and mycotoxin present (Battacone et al. 2009; Blank, Wolfram 2009; Masoero et al. 2009). Trials involving domestic animals involve many variables which are difficult to control between studies. The lack of a positive response reported in some trials

using these mycotoxin adsorbing agents has also been reported for other widely used feed additives such as probiotics or feed enzymes (Beauchemin et al. 2003; Robinson, Erasmus 2009). It is clear that more studies are needed to better understand the underlying factors inducing this variability and correctly evaluate their efficacy.

The present study, using a rat animal model, shows that a preparation exclusively composed of yeast cell walls extracted from *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026 significantly reduces intestinal absorption of AFB1. It is worth mentioning that in the toxicokinetic model used, rats were in a fasted state when the mycotoxin-YCW mixture was administered. Under natural conditions mycotoxins are contained in feeds and it is known that the presence of feeds in the gastrointestinal tract may affect the bioavailability of different xenobiotic molecules (Wonnemann et al. 2006; Disanto, Golden 2009).

The toxicokinetics of AFB1 and OTA were investigated using low mycotoxin doses. These doses were calculated based on the maximum concentrations allowed or tolerated in animal feeds by the European legislation (2002/32/CE and 2006/576/CE). In addition, these low doses are equivalent, in mg per kg BW, to the quantity that could be ingested by farm animals under normal production conditions. Although these mycotoxins have never been investigated in rats at such low oral levels blood and/or plasma kinetics of both toxins were in agreement with previous reports. Galtier *et al.*, (1979) and Coulombe and Sharma (1985) observed a biological half life of 55 h for OTA and 91.8 h for AFB1 (vs 63-65 h and 50-65h in the present study) following the oral administration of unlabeled OTA 2.5 mg kg<sup>-1</sup> BW and [<sup>3</sup>H]-AFB1 600 µg kg<sup>-1</sup> BW, respectively. The peak of radioactivity in blood was reached between 1 and 4 h following unlabeled OTA oral administration (Suzuki et al. 1977) and that of <sup>14</sup>C-AFB1 in plasma was reached 1 h after the same mode of administration (Wong, Hsieh 1978). Discrepancies with literature data were minor and may be due to differences in protocol design.

In the current study results from toxicokinetic parameters indicate that the YCW treatment modified the absorption phase. The AUC decreased in the YCW treated groups whereas the  $K_e$  was similar in all groups. In addition, the increase in cumulative radioactivity in faecal material was associated with a decrease in cumulative urinary excretion, mainly for AFB1 treatments. At the end of the experiment, up to 64% and 51% of total radioactivity was recovered in urine and faeces for AFB1 and OTA, respectively. This amount of recovery is normally found with tritium labelled molecules administered at very low levels (Beumer et al. 2006). Recovery can be improved if the radioactivity recovered from cages by washing and,

in the case of the first AFB1 experiment, the radioactivity fixed in the carcasses at the end of the trial is included in the calculation. Residual activity in carcasses of animals 360 h after administration of AFB1 was low indicating that a significant amount was eliminated by an alternative route. Other studies also reported a partial recovery of the total administrated radioactivity (Suzuki et al. 1977; Galtier et al. 1979; Coulombe, Sharma 1985; Kumagai et al. 1998), which could be explained by toxin retention within the kidneys in the case of OTA (Zepnik et al. 2003), or in liver in the case of AFB1 (Wogan et al. 1967) and by exhalation of tritiated water generated by exchange of the labelled  $^3\text{H}$  (Beumer *et al.* 2006). In our study with tritiated toxins, this latter route of elimination of radioactivity was highly probable.

*In vitro* studies demonstrated the adsorption of different mycotoxins such as AFB1 and OTA to viable cultures of *Saccharomyces cerevisiae* (Devegowda et al. 1994; Meca et al. in press). Preparations containing  $\beta$ -D-glucans portions of the specific strain 1026 exhibited a strong binding capacity *in vitro* for aflatoxins (up to 85%) while being poorer at sequestering OTA (12.4%) (Devegowda et al. 1998). Also, the extent of complexation, i.e. AFB1 > OTA, was not altered by pH values that are close to those found within the digestive tract (Yiannikouris et al. 2006). The *in vitro* binding affinity is in agreement with the *in vivo* results observed here in rats, further supporting the hypothesis that binding is a key property involved in the toxicity-alleviating effects of YCW.

Conversely, no dose effect of YCW was observed in the present study. A possible reason for this result could be the low level of mycotoxin used. The adsorptive capacity of yeast  $\beta$ -D-glucans *in vitro* was shown to be modulated by the amount of mycotoxins added to the medium according to a cooperative phenomenon. Binding of the first mycotoxin molecules induce conformation changes in  $\beta$ -glucans that facilitates access to new sites of fixation improving binding efficiency until saturation of all sites of adsorption (Yiannikouris et al. 2003; Yiannikouris et al. 2004a). In our study, toxin molecules were highly diluted and the minimum level of physical contacts capable to produce cooperative interactions was probably not fully achieved independently of YCW concentration.

The present study was based on measurements of radioactivity alone and provides no information on proportion of parent compounds and their metabolic products recovered in blood, faeces, urine or carcasses. It has to be noted that some of the radioactivity found in faeces in the first hours following administration could have been originated from liver-conjugated metabolites (Ha et al. 1999; Gross-Steinmeyer et al. 2002), particularly for AFB1, that are eliminated via the bile (Bassir, Osiyemi 1967; Kumagai, Aibara 1982). Nonetheless,

the decreased absorption and increased excretion observed in our experimental model indicates that the tested preparation may have the potential to protect monogastric animals against exposure to low dietary levels of selected mycotoxins.

### **Acknowledgments**

S. Firmin was supported by a doctoral fellowship (CIFRE 1058/2007), jointly financed by the Alltech company, ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique) and INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). We would like to thank Prof. J. Woodley for his help with the English language and Dr J.P. Cravedi from the laboratory of Xenobiotics INRA-Toulouse for facilitating the analysis of carcasses.

## References

- Bassir O, Osiyemi F. 1967. Biliary excretion of aflatoxin in the rat after a single dose. *Nature*. 215:882.
- Battaccone G, Nudda A, Palomba M, Mazzette A, Pulina G. 2009. The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *J Dairy Sci*. 92:4997-5004.
- Beauchemin KA, Colombatto D, Morgavi DP, Yang WZ. 2003. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminants. *J Anim Sci*. 81:E37-47.
- Beumer JH, Beijnen JH, Schellens JHM. 2006. Mass balance studies, with a focus on anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet*. 45:33-58.
- Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim Feed Sci Technol*. 137:265-282.
- Blank R, Wolfram S. 2009. Effects of live yeast cell supplementation to high concentrate diets on the toxicokinetics of ochratoxin A in sheep. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 26:119-126.
- Chowdhury SR, Smith TK, Boermans HJ, Woodward B. 2005. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poult Sci*. 84:1841-1850.
- Coulombe RA, Jr., Sharma RP. 1985. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. *Food Chem Toxicol*. 23:827-830.
- Devegowda G, Aravind B, Nazar A, Rajendra K, Morton M, Baburathna A, Sudarshan C. 1994. A biological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and ducklings by the use of *Saccharomyces cerevisiae* cultures added to feed. Paper presented at: Biotechnology in the feed industry Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium Loughborough, Nottingham University Press.
- Devegowda G, Raju MVLN, Nazar A, Swamy HVLN. 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. *Biotechnology in the feed industry Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium: passport to the year 2000* p. 241-255.
- Diaz DE, Hagler WM, Jr., Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW. 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*. 157:233-241.
- Disanto AR, Golden G. 2009. Effect of food on the pharmacokinetics of clozapine orally disintegrating tablet 12.5 mg: a randomized, open-label, crossover study in healthy male subjects. *Clin Drug Investig*. 29:539-549.
- Galtier P, Charpentreau JL, Alvinerie M, Labouche C. 1979. The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metab Dispos*. 7:429-434.
- Garon D, Richard E, Sage L, Bouchart V, Pottier D, Lebailly P. 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: Experimental study. *J Agric Food Chem*. 54:3479-3484.
- Gross-Steinmeyer K, Weymann J, Hege H-G, Metzler M. 2002. Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J Agric Food Chem*. 50:938-945.
- Ha TG, Mar WC, Kim SG, Surh Y-J, Kim ND. 1999. Enhancement of biliary excretion of aflatoxin B1 and suppression of hepatic ornithine decarboxylase activity by 2-(allylthio)pyrazine in rats. *Mutat Res*. 428:59-67.

- Jouany JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 137:342-362.
- Korosteleva SN, Smith TK, Boermans HJ. 2007. Effects of feedborne *Fusarium* mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows. *J Dairy Sci.* 90:3867-3873.
- Kumagai S, Aibara K. 1982. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 64:94-102.
- Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Ito Y, Noguchi Y, Yamamoto Y, Ogura A. 1998. The fate and acute toxicity of aflatoxin B1 in the mastomys and rat. *Toxicol.* 36:179-188.
- Kutz RE, Sampson JD, Pompeu LB, Ledoux DR, Spain JN, Vazquez-Anon M, Rottinghaus GE. 2009. Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B1. *J Dairy Sci.* 92:3959-3963.
- Lellouch J, Lazar P. 1996. *Méthodes statistiques en expérimentation biologique.* Paris, France: Flammarion.
- Mansfield MA, Jones AD, Kuldau GA. 2008. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. *Phytopathology.* 98:330-336.
- Masoero F, Gallo A, Diaz D, Piva G, Moschini M. 2009. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 150:34-45.
- Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G, Diaz D. 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal.* 1:1344-1350.
- Meca G, Blaiotta G, Ritieni A. in press. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control.*
- Nguyen TH, Fleet GH, Rogers PL. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50:206-12.
- Niderkorn V, Boudra H, Morgavi DP. 2007. Les fusariotoxines: comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants? *Fourrages.* 111-123.
- Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol.* 78:21-37.
- Pradelles R, Alexandre H, Ortiz-Julien A, Chassagne D. 2008. Effects of yeast cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity in model wine. *J Agric Food Chem.* 56:11854-61.
- Raymond SL, Smith TK, Swamy HV. 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J Anim Sci.* 81:2123-2130.
- Robinson PH, Erasmus LJ. 2009. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products: A systematic review of the literature. *Anim Feed Sci Technol.* 149:185-198.
- Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT. 1998. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit Contam.* 15:30-55.
- Stroud JS, 2006, The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. *Graduate Faculty of North Carolina State University Thesis* (Raleigh: North Carolina State University), pp. 46.
- Suzuki S, Satoh T, Yamazaki M. 1977. The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Jpn J Pharmacol.* 27:735-744.

- Swamy HV, Smith TK, MacDonald EJ, Boermans HJ, Squires EJ. 2002. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J Anim Sci.* 80:3257-67.
- Waltman L, 2008, Effect of sequestering agents on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. *Graduate Faculty of North Carolina State University Thesis* (Raleigh: North Carolina State University), pp. 108.
- Wogan GN, Edwards GS, Shank RC. 1967. Excretion and tissue distribution of radioactivity from aflatoxin B1-<sup>14</sup>C in rats. *Cancer Res.* 27:1729-1736.
- Wong ZA, Hsieh DP. 1978. Aflatoxicol: major aflatoxin B1 metabolite in rat plasma. *Science.* 200:325-7.
- Wonnemann M, Schug B, Schmucker K, Brendel E, van Zwieten PA, Blume H. 2006. Significant food interactions observed with a nifedipine modified-release formulation marketed in the European Union. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 44:38-48.
- Yiannikouris A, Andre G, Poughon L, Francois J, Dussap CG, Jeminet G, Bertin G, Jouany JP. 2006. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules.* 7:1147-1155.
- Yiannikouris A, Francois J, Poughon L, Dussap CG, Bertin G, Jeminet G, Jouany JP. 2004a. Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Food Prot.* 67:1195-200.
- Yiannikouris A, Francois J, Poughon L, Dussap CG, Bertin G, Jeminet G, Jouany JP. 2004b. Alkali extraction of  $\beta$ -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J Agric Food Chem.* 52:3666-3673.
- Yiannikouris A, Poughon L, Cameleyre X, Dussap CG, Francois J, Bertin G, Jouany JP. 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotech Lett.* 25:783-789.
- Zepnik H, Volkel W, Dekant W. 2003. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 192:36-44.

Table 1. Mean toxicokinetic parameters in plasma after a single dose of aflatoxin B1 at two concentrations and ochratoxin A with and without co-administration of a yeast cell wall preparation in rats

Parameters	Aflatoxin B1 (18.12 µg/kg BW)			Aflatoxin B1 (0.716 µg/kg BW)			Ochratoxin A (3.22 µg/kg BW)		
	Control	YCW-L	YCW-H	Control	YCW-L	YCW-H	Control	YCW-L	YCW-H
<b>C<sub>max</sub> (ng/ml/kg BW)</b>	<b>3.66</b>	<b>1.91</b>	<b>2.26</b>	<b>0.72</b>	<b>0.27</b>	<b>0.35</b>	<b>28.78</b>	<b>20.84</b>	<b>21.47</b>
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	<b>4.0</b>	<b>4.0</b>	<b>4.0</b>	<b>4.0</b>	<b>5.0</b>	<b>4.0</b>	<b>5.0</b>	<b>5.0</b>	<b>5.0</b>
<b>K-elimination (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
<b>T<sub>1/2</sub> (h)</b>	<b>53.3</b>	<b>55.5</b>	<b>53.7</b>	<b>63.6</b>	<b>65.4</b>	<b>65.4</b>	<b>63.6</b>	<b>65.4</b>	<b>65.4</b>
<b>AUC 0-72h(ng/ml/kg BW)</b>	<b>129.0</b>	<b>82.4</b>	<b>111.0</b>	<b>32.4</b>	<b>19.8</b>	<b>19.9</b>	<b>1731.3</b>	<b>1260.6</b>	<b>1337.9</b>
<b>AUC 0-∞(ng/ml/kg BW)</b>	<b>131.4</b>	<b>83.9</b>	<b>113.1</b>	<b>32.9</b>	<b>20.1</b>	<b>20.2</b>	<b>1758.5</b>	<b>1279.8</b>	<b>1358.4</b>
<b>ΔAUC 0-∞(%)</b>		<b>36.1</b>	<b>13.9</b>		<b>38.9</b>	<b>38.9</b>		<b>27.2</b>	<b>22.8</b>

$C_{max}$  = maximum plasma concentration;  $t_{max}$  = time to reach  $C_{max}$ ; K-elimination = elimination constant;  $T_{1/2}$  = terminal elimination half-life; AUC = area under the plasma concentration versus time curve from 0 to 72 h, 72 to infinite, and 0 to infinite, respectively. Pharmacokinetic parameters were calculated from a concentration-time curve made from samples obtained from three different rats at each sampling point except for  $C_{max}$  and  $t_{max}$  which are the mean of all  $C_{max}$  and  $t_{max}$  values obtained.

Table 2. Cumulative excretion of mycotoxins after a single dose of aflatoxin B1 at two concentrations and ochratoxin A with and without co-administration of a yeast cell wall preparation in rats

<i>Experiment<sup>a</sup></i>	Cumulative excretion (% mean±SD) of radioactivity					
	Urines <sup>b</sup>	Faeces <sup>b</sup>	Total excreted <sup>c</sup>	Cage rinse <sup>c</sup>	Carcass <sup>c</sup>	Average recovery of administered <sup>3</sup> H
<i>Aflatoxin B1 (18.12µg/kg BW)</i>						
Control	8.7±2.9	23.8±5.8	51.7	3.9±1.5	2.9	58.5
YCW-L <sup>d</sup>	4.9±0.8	31.6±3.5	55.0	2.2±0.1	1.8	59.1
YCW-H	4.8±1.3	39.6±27.0	58.1	4.5±0.1	NA	63.7
<i>Aflatoxin B1 (0.716 µg/kg BW)</i>						
Control	6.1±2.0	39.0±3.4	45.1	1.3±0.5	NA	46.4
YCW-L	2.9±1.1 *	59.6±18.2 *	62.5	0.9±0.6	NA	63.5
YCW-H	3.3±1.6 *	61.2±16.9 *	64.5	0.9±0.4	NA	57.8
<i>Ochratoxin A (3.22 µg/kg BW)</i>						
Control	5.6±1.3	16.3±2.6	44.1	5.1±1.2	NA	49.1
YCW-L	6.5±2.3	23.8±4.9 *	49.3	2.4±0.7	NA	51.7
YCW-H	6.7±1.6	28.7±6.4 *	51.8	2.0±0.8	NA	53.8

<sup>a</sup> values are means±SD, n= 5 rats, except for aflatoxin B1 (18.12µg/kg body weight (BW)) where 3 rats were used.

<sup>b</sup> Excreted at 72 h

<sup>c</sup> Recovered at the end of the collection period that was 15, 3, and 10 days for aflatoxin B1 18.12 and 0.716, and ochratoxin A 3.22 µg/kg BW, respectively. NA: not analyzed.

<sup>d</sup> Yeast cell wall preparation at low (YCW-L) and high (YCW-H) concentration. See Materials and Methods for details.

\*  $p < 0.05$  between yeast cell wall treatments and controls for each column within each experiment.

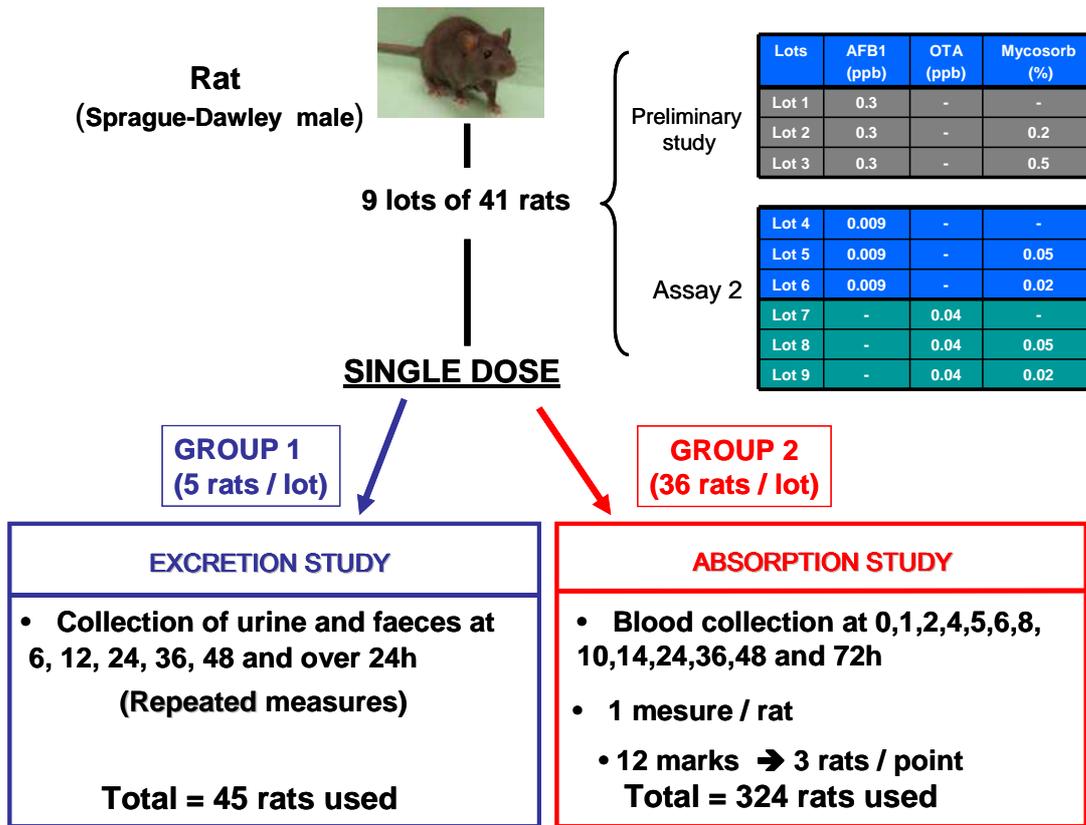


Figure 1. Protocol design of the study

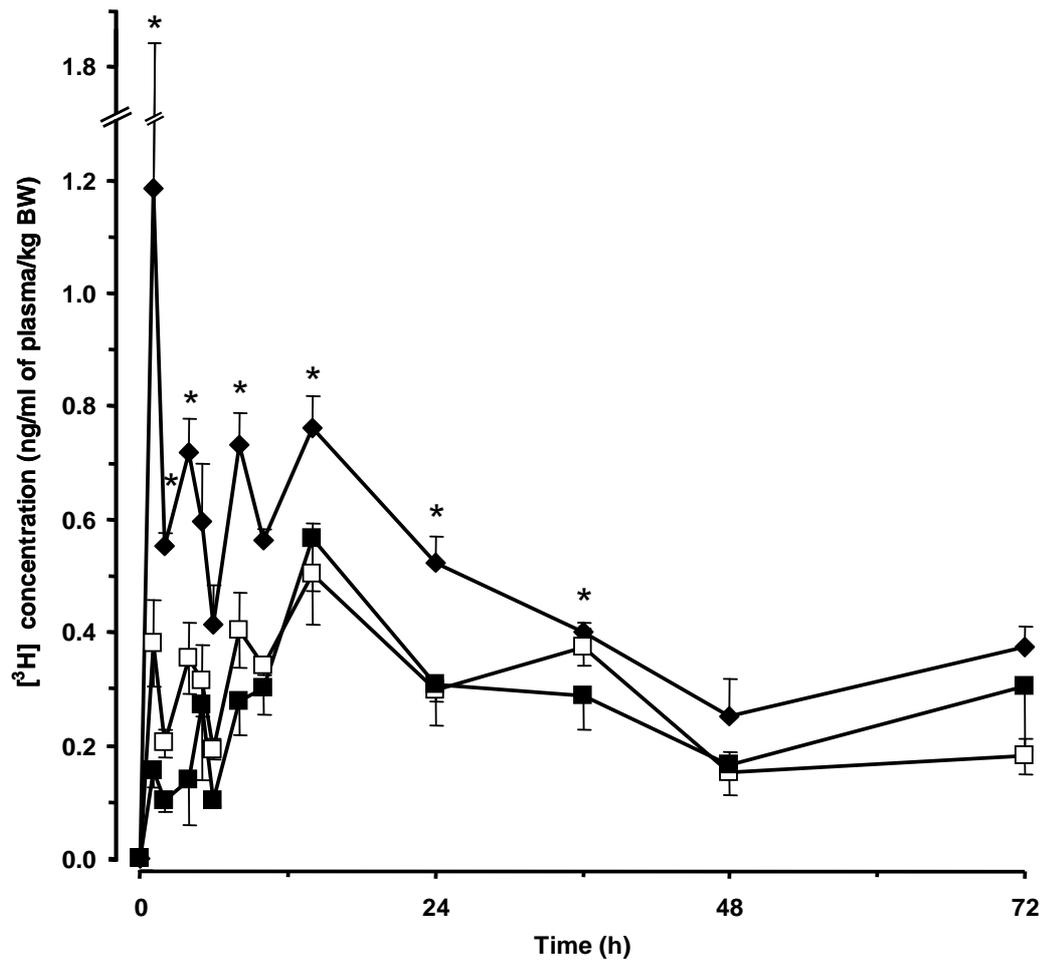


Figure 2. Plasma time versus concentration profiles of aflatoxin B1 obtained after a single oral administration of  $0.716 \mu\text{gkg}^{-1}$  body weight with (■, low; □, high) and without (◆) co-administration of a yeast cell wall preparation in rats. \* $p < 0.05$  between groups.

Développer de nouveaux agents adsorbants organiques capables de séquestrer les aflatoxines et les ochratoxines dans le TGI des animaux d'élevage représente un enjeu important pour l'industrie agro-alimentaire. L'atteinte de cet objectif nécessite une bonne connaissance de la capacité de ces adsorbants à réduire la biodisponibilité des mycotoxines dans l'organisme. Il est donc important de déterminer, très tôt dans le développement, les effets d'un adsorbant sur l'absorption et l'excrétion des mycotoxines et pour cela il est nécessaire d'avoir des modèles permettant d'étudier la toxicocinétique des mycotoxines.

Dans la première partie du travail, nous avons mis au point un test permettant montrer en temps limité que la paroi de levure testée peut assurer une réduction de la biodisponibilité de l'AFB1 et de l'OTA dans l'organisme du rat exposé à des doses inférieures aux teneurs réglementaires de l'alimentation animale distribuée en Europe. L'addition de l'adsorbant à l'alimentation entraîne une diminution significative de l'absorption de l'AFB1 mais moins marquée pour l'OTA. Ces résultats ont ensuite été confirmés par l'étude toxicocinétique.

Les essais menés chez le rat valident *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* sur la séquestration des mycotoxines testées dans cette thèse. Il est cependant difficile de transposer les résultats obtenus avec ce modèle monogastrique aux conditions d'élevage des ruminants à cause des spécificités digestives de chaque espèce. La présence des microorganismes fermentaires dans les compartiments pré-gastriques et l'ingestion de fourrages, sources importante de FND peuvent également moduler l'absorption (Westlake et al., 1989) et séquestrer les mycotoxines (Carson and Smith, 1983, Smith, 1980). Pour évaluer l'efficacité d'un adsorbant chez le ruminant, il est nécessaire d'étudier la biodisponibilité des mycotoxines dans l'organisme de l'animal.

La seconde partie de la thèse, consacrée aux essais chez la brebis laitière, a été réalisée pour valider le concept d'efficacité de détoxification sur le modèle ruminant. L'objectif de ces essais est de savoir si la réduction de l'absorption de l'AFB1 peut réellement être observée chez le modèle ruminant et apporter des bénéfices sur les performances de production de l'animal.

A la différence de l'étude menée chez le modèle rat, l'évaluation n'a porté que sur des critères d'excrétion à savoir la balance d'excrétion et le transfert dans le lait. Le suivi des

aflatoxines a été réalisé après administration orale de mycotoxines froides. Ces essais ont été précédés de la production d'aliment contaminé ainsi que de la mise au point et de la validation de méthodes de dosage de l'AFB1 et de l'AFM1 dans le lait, l'urine et les fèces.

Nous avons fait le choix de produire de l'aliment artificiellement contaminé plutôt que d'utiliser de l'aliment naturellement contaminé pour la préparation des aliments expérimentaux. Ce choix a été guidé par le besoin de disposer d'aliment contenant de l'AFB1 en quantité suffisante pour permettre le suivi de la mycotoxine et de son métabolite l'AFM1 dans les matrices biologiques par une technique CLHP couplée à un détecteur de fluorescence.

D'autre part, l'aliment naturellement contaminé ne contient généralement pas qu'un seul groupe de mycotoxines mais plusieurs. La production d'aliment artificiellement contaminé présentait aussi l'avantage de pouvoir étudier les effets de la paroi de levure sur la biodisponibilité de l'AFB1 chez la brebis sans se soucier de la présence possible des autres familles de mycotoxines. Elle nous permettait aussi d'éliminer toute possibilité de variation de valeur alimentaire entre les groupes d'animaux et d'attribuer les changements observés sur les paramètres zootechniques uniquement à l'exposition par les aflatoxines et la paroi de levure.

La mise en place des techniques de dosages des aflatoxines froides dans les matrices biologiques a demandé un travail analytique important. Très peu de travaux ont été réalisés sur la toxicocinétique de l'AFB1 chez le ruminant. Les données quantitatives existantes sur l'excrétion fécale et urinaire des aflatoxines proviennent essentiellement d'études anciennes utilisant des techniques d'analyse radiochimique inadaptables et de chromatographie sur couche mince (CCM) imprécises. D'autres techniques chromatographiques (CLHP) ont été développées plus récemment pour quantifier l'AFB1 et l'AFM1 dans l'urine et les fèces chez le rat. Mais tenant compte des écarts entre les volumes d'excréments produits par les deux espèces, ces méthodes ne semblaient pas assez sensibles pour doser l'urine et les fèces de brebis. Les méthodes analytiques<sup>1,2</sup> que nous avons développées s'inspirent des méthodes publiées sur le dosage de l'AFB1 et l'AFM1 dans d'autres matrices (tissus) et le dosage d'autres mycotoxines dans l'urine et les fèces (Chiavaro et al., 2005, Manetta et al., 2005,

---

<sup>1</sup> Mode opératoire. Méthode de dosage par CLHP et détection fluorimétrique de l'aflatoxine M1 dans l'urine (Annexe 1)

<sup>2</sup> Mode opératoire. Méthode de dosage par CLHP et détection fluorimétrique des aflatoxines B1, M1, G1, B2 dans les fèces (Annexe 2)

Mykkanen et al., 2005, Vettorazzi et al., 2008). Nous avons reproduit une méthode officielle de l'AFSSA pour doser l'AFM1 dans le lait.

## II. LE DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE

### A. Les choix méthodologiques

#### 1. Les marqueurs d'exposition

La consommation d'aliments contaminés par les aflatoxines conduit à la production de nombreux métabolites dans l'organisme du ruminant. Ces produits issus du métabolisme sont caractérisés par des propriétés physico-chimiques différentes (polarité, intensité de fluorescence) et des concentrations variables selon les matrices biologiques.

Il aurait été intéressant de suivre l'ensemble de ces métabolites dans l'organisme animal pour évaluer l'efficacité de l'adsorbant et améliorer notre connaissance sur la toxicocinétique des aflatoxines chez le ruminant. Cependant le développement d'une méthode unique multirésiduelle est complexe à réaliser en raison de cette diversité de métabolites. Une approche multirésidus soulève également des problèmes d'approvisionnement en standards purs d'aflatoxines. Tenant compte de ces difficultés analytiques, il a été nécessaire de sélectionner les composés à analyser. Nous avons donc réduit le choix du nombre de résidus à rechercher à deux composés, l'AFB1 et son métabolite, l'AFM1.

Notre choix s'est focalisé sur l'analyse de l'AFB1 plutôt que sur les autres aflatoxines présentes dans l'alimentation expérimentale du fait que ce contaminant alimentaire est le plus toxique et le plus commun de la famille des aflatoxines.

L'AFM1 présente un intérêt particulier à être étudiée car ce composé est excrété dans les trois matrices biologiques, le lait, l'urine et les fèces. Par ailleurs, l'AFM1 est le principal représentant de l'AFB1 dans le lait et l'urine ce qui en fait un bon marqueur d'exposition.

#### 2. La détection fluorimétrique

Une revue de la littérature montre que différentes procédures analytiques ont été mises en œuvre pour déterminer l'AFB1 et l'AFM1 dans des échantillons de fèces, d'urine, comme indiqué dans le **tableau 10**. Les aflatoxines sont souvent analysées en chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à différents détecteurs (Cigic and Prosen, 2009).

La CLHP gagne en sensibilité grâce au couplage avec la spectrométrie de masse (SM) et permet d'atteindre des limites de détection très faibles. La SM est un outil performant pour l'identification et la quantification des mycotoxines présentes à l'état de traces dans les matrices complexes (Zöllner and Mayer-Helm, 2006). Cette technique est aussi intéressante pour analyser conjointement plusieurs composés ayant des propriétés physicochimiques différentes tels que les aflatoxines. Cependant, il n'était pas nécessaire de recourir à ce type d'instrument pour atteindre notre objectif de développement de méthodes d'analyse de l'AFM1 et de l'AFB1 dans les fèces, l'urine et le lait.

D'autres outils de détection aux performances analytiques satisfaisantes peuvent être utilisés. La fluorimétrie semblait la mieux adaptée et a été retenue compte tenu des propriétés fluorescentes de l'AFB1 et de l'AFM1, de sa facilité et de son coût de mise œuvre. Cette technique permet l'analyse de composés possédant un fluorophore ce qui la rend beaucoup plus sélective et plus sensible que la détection UV.

## **B. L'optimisation des conditions analytiques**

L'optimisation des conditions analytiques a consisté à rechercher une sensibilité optimale et une séparation chromatographique de l'AFM1 et de l'AFB1 en un temps raisonnable (< 20 min).

### **1. L'optimisation de la détection**

L'essentiel du travail a porté sur l'optimisation de la détection des aflatoxines ciblées. L'AFB1 et l'AFM1 sont présentes en faibles quantités dans les matrices biologiques et une étape de pré-concentration avant leur analyse et leur détermination est indispensable.

La méthode mise au point pour le dosage des aflatoxines dans les 3 matrices intègre une étape de purification sur des colonnes d'immunoaffinité (IAC) durant la préparation des échantillons. Avec cette méthode, les extraits de fèces, de lait et d'urine sont passés sur des cartouches sur lesquels sont greffées des anticorps monoclonaux. Les aflatoxines s'y adsorbent puis sont éluées par un ou plusieurs volumes de solvants qui dénaturent la liaison anticorps-antigène.

Les supports sélectionnés sont les colonnes Aflaprep® et Aflaprep M®, (R-Biopharm) déjà employées pour l'analyse de l'AFM1 dans le lait et de l'AFB1 dans plusieurs matrices

alimentaires. Cependant, ces supports n'ont jamais été testés pour la purification d'extraits de fèces et d'urine. Des essais ont donc été nécessaires afin de confirmer les performances des colonnes IAC.

L'urine, les fèces et le lait sont des matrices complexes dans lesquelles les aflatoxines sont en présence avec d'autres composés (graisses, fibres végétales, protéines) susceptibles d'encrasser la colonne IAC et d'interférer avec la fixation des composés d'intérêts au cours de la percolation de l'échantillon.

Les extraits ont donc été traités avant leur dépôt sur les colonnes. La graisse du lait a été retirée par la centrifugation suivie de la filtration des échantillons. Les protéines de l'urine ont été dénaturées par l'ajout de méthanol puis séparées des échantillons par centrifugation. Des rendements de récupération acceptables ont ainsi pu être obtenus après purification des extraits de lait et d'urine supérieurs à 85 %.

Concernant les fèces, une étape d'extraction liquide a été mise en œuvre avant la purification sur colonne d'IAC. L'objectif était de pouvoir éliminer de façon sélective, par passage d'un solvant convenablement choisi, les composés co-extraits interférents.

Différents mélanges de solvants organiques ont été testés pour optimiser les rendements d'extraction de l'AFB1 et l'AFM1 des échantillons de fèces. Les deux aflatoxines sont faiblement retenues sur les colonnes IAC lorsque l'extraction est réalisée avec de l'eau ou un mélange eau/méthanol. En revanche, les taux de récupération sont supérieurs ou égaux à 93% lorsque les deux composés sont extraits par un mélange eau : chloroforme. Ce mélange a donc été choisi pour l'analyse des fèces.

Pour améliorer la détection de l'AFB1 dans les fèces, une étape de dérivation a du être ajoutée en sortie en colonne CLHP. Cette dérivation est assurée par une réaction de bromination de la double liaison 8,9 de l'AFB1 qui entraîne la formation d'un composé beaucoup plus fluorescent.

Un essai d'hydrolyse enzymatique a également été réalisé pour atteindre une détection optimale de l'AFB1 et d'AFM1 dans l'urine. En effet, l'AFB1 et ses métabolites peuvent être excrétés dans l'urine sous forme libre ou conjuguée (Kussak et al., 1995). Des échantillons d'urine de brebis ont été incubés avec une glucuronidase et une sulfatase afin de libérer les métabolites conjugués et d'obtenir la meilleure sensibilité possible de l'AFB1 et l'AFM1. Cependant, le traitement n'a eu aucune influence sur les taux d'AFM1 indiquant l'absence d'AFM1 conjugués dans les extraits d'urine. Par ailleurs, l'AFB1 n'a pas pu être mis en

évidence dans les échantillons traités et non traités, contrairement à d'autres travaux indiquant la présence résiduelle d'AFB1 dans l'urine de ruminants (Nabney et al., 1967, Stubblefield et al., 1982). Ces résultats suggèrent que la limite de détection de notre méthode est trop élevée pour détecter les traces d'AFB1 libres et conjuguées présents dans les échantillons d'urines.

## **2. L'optimisation de la séparation chromatographique**

Tenant compte du nombre important d'échantillons à doser, le point principal considéré pour optimiser les conditions de séparation chromatographique des deux aflatoxines est la durée totale de l'analyse.

Différents mélanges de solvants (acétonitrile, méthanol, propanol, eau) ont été sélectionnés sur la base des méthodes analytiques reportées dans la littérature (Polychronaki et al., 2008, Manetta et al., 2005). Le temps de rétention des aflatoxines a été optimisé en ajustant la composition et le débit de chaque phase mobile. Les caractéristiques de l'appareillage, les conditions analytiques retenues après optimisation et le temps de rétention de chaque mycotoxine sont répertoriés dans le **tableau 11**.

Les méthodes d'analyses optimisées assurent la rapidité du dosage de l'AFM1 et l'AFB1 dans les matrices biologiques. Les analyses sont effectuées en milieu isocratique et durent moins de 15 min. Leur mise en œuvre ne nécessite ni rééquilibrage, ni lavage de la colonne analytique.

## **C. La procédure de validation**

Une validation a été réalisée afin de montrer que les méthodes mises au point sont robustes dans les conditions analytiques dans lesquelles elles ont été appliquées. Pour chaque matrice, les critères de performance suivants ont été contrôlés: sélectivité, linéarité, rendements de récupération, précision et exactitude, ainsi que la stabilité.

La sélectivité des méthodes est assurée par la spécificité du temps de rétention de chacune des molécules ciblées, celle-ci se vérifiant par l'injection de solutions pures d'aflatoxines. Elle se caractérise par l'absence d'impuretés et de pics d'interférence aux temps

de rétention de l'AFB1 et de l'AFM1 dans les extraits de fèces, d'urine et de lait prélevés sur les animaux avant et après contamination (**Figure 13**).

Les autres critères de validation sont également satisfaisants pour les 3 matrices testées (**Tableau 12**).

Le domaine de linéarité a été estimé en analysant 6 solutions étalons et dans les gammes de concentrations allant de 0.5 à 100 ng/mL. Ceci permet de définir la droite de calibration dans ce domaine de linéarité, et le coefficient de régression ( $r^2$ ) pour chacune des deux aflatoxines ciblées. Nous avons ainsi pu observer une bonne linéarité entre le signal de fluorescence et la concentration de chaque aflatoxine avec un bon coefficient de régression ( $r^2 < 0.99$ ).

Les limites de quantification (LOQ) ont été déterminées à partir de mesures faites sur un blanc analytique (extrait d'échantillon non contaminé) en prenant comme valeur du signal 10 fois la valeur du bruit de fond. En tenant compte de la prise d'essai initiale et des facteurs de correction liés aux étapes de traitement des échantillons (extraction, purification, évaporation), nous avons estimé les concentrations quantifiables dans les fèces, l'urine et le lait. Les limites varient selon la matrice. La LOQ dans le lait est la plus faible. Elle atteint une valeur de 5 pg.ml<sup>-1</sup> et permet de quantifier l'AFM1 à un seuil inférieur à la limite réglementaire (25 pg.ml<sup>-1</sup>).

Pour l'urine et les fèces, les valeurs de LOQ calculées sont supérieures et estimées à 0.85 ng.ml<sup>-1</sup> et 0.5 ng.g<sup>-1</sup>, respectivement. La méthode développée pour doser l'urine est moins sensible que celle proposée par Kussak et al., (1995) mais ceci à la faveur d'une mise en œuvre moins complexe et plus appropriée pour analyser un nombre important d'échantillons. La sensibilité de la méthode de dosage de l'AFB1 et de l'AFM1 dans les fèces est également satisfaisante et permet d'atteindre des seuils de quantification comparables aux méthodes existantes (Gratz et al., 2006).

Les étapes de préparation des échantillons sont sources d'erreurs de manipulation et de pertes d'analytes. Des échantillons de contrôle qualité (CQ) ont donc été préparés à 2 niveaux de concentrations en surchargeant des matrices animales non contaminées (mélange d'échantillons des animaux témoins) avec des solutions pures d'aflatoxines. Les échantillons

CQ ont été analysés quotidiennement pour mesurer les rendements de récupération, la précision, l'exactitude de la méthode et la stabilité des toxines durant la conservation.

Les méthodes analytiques mises au point sont fiables pour quantifier les aflatoxines dans les 3 matrices. Les écarts observés entre les concentrations mesurés et les concentrations théoriques des échantillons CQ sont faibles. Les rendements de récupération sont satisfaisants, supérieurs à 83% pour les deux aflatoxines considérées. Les mesures sont répétables. La moyenne des coefficients de variation est inférieure à la valeur d'incertitude de mesure fixée à 15% pour chaque matrice.

Les concentrations des échantillons CQ mesurées après 3 et 6 mois de stockage à -20 °C sont comparables à celles obtenues lors de leur préparation indiquant que l'AFB1 et l'AFM1 sont stables dans toutes les matrices dans les conditions de conservation appliquées. Nous avons également pu vérifier que les extraits en attente d'analyse étaient stables durant 24h dans le passeur d'échantillon de la chaîne CLHP.

En conclusion, trois méthodes d'analyse par CLHP-FLD ont été mises au point pour le dosage de l'AFB1 et d'AFM1 dans les fèces ainsi que l'AFM1 dans l'urine et le lait. Les caractéristiques de ces méthodes ont été évaluées et l'incertitude mesurée. Cette étude conduit à la validation du protocole analytique pour la réalisation d'un suivi de l'AFB1 dans l'organisme de brebis nourries à de l'aliment contaminé en aflatoxines.

### **III. EVALUATION DE L'EFFET D'UNE PREPARATION DE PAROIS DE LEVURE SUR L'ABSORPTION GASTRO-INTESTINALE DES AFLATOXINES CHEZ LA BREBIS LAITIERE**

*Publication-Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes.*

### **Interpretative Summary**

Yeast cell wall extracts reduce aflatoxin absorption in dairy ewes by Firmin et al. Aflatoxins are toxic fungal metabolites associated with feedstuffs that can affect production and health of livestock and could affect consumers as toxins can be transferred into animal products. A modified yeast cell wall extract changed the excretion balance of aflatoxin-contaminated feed fed to dairy ewes. The observed increase in aflatoxin elimination in feces is a direct indication that the yeast product impaired aflatoxin absorption and suggests that dietary supplementation with this yeast cell wall extract could protect ruminants against the toxic effects of aflatoxins in feed.

Running head: REDUCTION OF AFLATOXIN ABSORPTION IN EWES

## **Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes**

**S. Firmin<sup>\*†</sup>, D. P. Morgavi<sup>\*</sup>, A. Yiannikouris<sup>‡</sup> and H. Boudra<sup>\*1</sup>**

*<sup>\*</sup>INRA, UR1213, Herbivores, Centre de Clermont-Theix, F-63122 Saint Genès-Champanelle, France*

*<sup>†</sup>Alltech-France, European Regulatory Department, F-92593 Levallois-Perret, France*

*<sup>‡</sup>Alltech Inc., Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition, 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356, USA*

<sup>1</sup>Corresponding author:

H. Boudra, French Institute for Agricultural Research (INRA), Herbivore Research Unit,  
63122 St Genès-Champanelle, France

Phone number: +33 473 624104

Fax number: +33 473 624659

hboudra@clermont.inra.fr

## **ABSTRACT**

This study investigated the effect of a modified yeast cell wall extract preparation (YCW) on the excretion of Aflatoxin B1 (AFB1) and Aflatoxin M1 (AFM1) in feces, urine and milk in dairy ewes fed an aflatoxin-contaminated diet. Sixteen ewes in mid-lactation were assigned to four treatment groups: Control, AF [60 µg AFB1/kg of feed], YCW [2 g/kg of feed] and AF +YCW. The trial consisted of a 3-d exposure, short-term period, followed by a 21-d, long-term exposure period. At the end of each exposure period, milk, urine and feces were collected over 72 h. The treatments did not affect feed intake, milk production, milk composition and body weight. The presence of AFM1 was detected in all matrices while AFB1 was only present in feces. Daily excretion was higher in the long-term exposition and reached up to 26.9 µg AFB1/d and 37.2 µg AFM1/d in feces and up to 10.7 µg/d AFM1 in urine. YCW supplementation was effective in increasing aflatoxins excretion in feces in the long-term exposure (up to 156% increase). The effect was accompanied by a trend of decreasing urinary excretion of AFM1. In contrast, the addition of YCW to the contaminated diet did not affect the transfer of aflatoxins from feed to milk under the present experimental conditions with low producing ewes. The transfer rates of AFM1 in milk ranged from 0.24 to 0.54%. In conclusion, these results show that feed supplementation with an YCW extract reduced the absorption of AFB1 and increased the elimination of AFB1 and AFM1 in ewe's feces. YCW could be used to protect ruminants against chronic exposure to aflatoxins present in feeds.

**Key words:** aflatoxins, mycotoxins, dairy sheep, yeast cell wall extract, excretion

## INTRODUCTION

Aflatoxins are secondary metabolites produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Aflatoxin B1 (AFB1), the most abundant in naturally contaminated foods and feeds, is toxic and carcinogenic to humans and animals. When ingested by ruminants, AFB1 is partly metabolized in the liver to a more polar compound: aflatoxin M1 (AFM1), which is as toxic as the parent toxin and can be excreted in urine, feces and milk (Allcroft et al., 1967). AFB1 and AFM1 are both classified as a group 2B human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. Aflatoxin contamination occurs frequently in agricultural commodities and poses a major threat to farm animal and human health. In ruminants, toxic effects are associated with liver damage, diminished growth efficiency, diminished milk production and quality, impaired resistance to infectious diseases, and impaired vaccine-induced immunity (Morgavi et al., 2008). Tainted milk and dairy products are the main sources of aflatoxin ingestion by humans in Europe (Prandini et al., 2009).

Several approaches have been investigated to reduce the risk of aflatoxicosis in livestock (Jouany, 2007). Biological, chemical or physical treatments can minimize toxin production and eliminate contaminants in food and feeds but are not extensively applied in practice due to their cost and limited efficacy (Niderkorn et al., 2007). One approach to reduce the incidence of aflatoxicosis in farm animals is the use of feed additives that restrict the bioavailability of toxins. Mineral adsorbents such as clays or activated carbons have been extensively tested for their potential to complex aflatoxins and impair their gastrointestinal absorption (Kabak et al., 2006). However, these compounds are relatively inefficient towards others mycotoxins and can also impair the absorption of some micro-nutrients (Huwig et al., 2001).

The use of organic materials such as yeast cell walls is a technological alternative being explored to confront the problem of multi-mycotoxin contamination of feedstuffs. Among these organic additives, a preparation of chemically modified *Saccharomyces cerevisiae* cell wall (YCW), has been shown to adsorb selected major mycotoxins *in vitro* (Shetty and Jespersen, 2006, Yiannikouris et al., 2004) and to alleviate the effect of dietary mycotoxin exposure in various animal species (Chowdhury et al., 2005, Diaz-Llano and Smith, 2006, Diaz et al., 2004).

Most *in vivo* experiments performed to date to evaluate the efficacy of YCW adsorbing agents have measured nonspecific parameters such as production performance and the onset of toxicity. There is less information available on how sequestering agents affect toxicokinetics and excretion of AFM1 in lactating dairy ruminants. The objective of the present study was to investigate the effect of a modified YCW extract preparation on the excretion of AFB1 and AFM1 in feces, urine and milk in mid-lactation dairy ewes fed an aflatoxin-contaminated diet.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Preparation of Aflatoxin-contaminated Wheat***

AFB1-contaminated feed was produced by culture of a toxigenic *Aspergillus flavus* strain kindly provided by Thomas Ostenfeld Larsen from the Technical University of Denmark. Whole grain wheat was adjusted to 34% moisture and placed in a 5-L gas-permeable bag (Full-Gas Microsac, Saco2, Eke, Belgium), sterilized by autoclaving (12°C, 20 min). Wheat was inoculated with pieces of agar medium from a 1-wk-old culture of *A. flavus*. The bag was incubated at 25°C for 4 wk, autoclaved (121°C, 20 min) to stop the fungal growth and the contents dried at 80°C for 48 h. The dried grains were then ground to pass a 0.5 mm mesh and analyzed for aflatoxins. Concentrations of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 in the

contaminated wheat were  $30 \pm 0.1$ ,  $25 \pm 1$ ,  $3.5 \pm 0.2$ , and  $6.0 \pm 0.2$   $\mu\text{g/g}$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ ), respectively.

### ***Animals and Experimental Design***

The experiment was conducted at the animal experimental facilities of the INRA's Herbivores Research Unit (Saint-Genès Champanelle, France). Procedures on animals were in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and all other applicable national and European guidelines and regulations for experimentation with animals (see [http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc\\_regl.html](http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html) for details). The experimental protocol was approved by the Regional Ethics Committee on Animal Experimentation (n° CE4-10).

Sixteen Laucane dairy ewes in mid lactation at the start of the adaptation period ( $67.3 \pm 3.3$  kg BW,  $3.0 \pm 0.9$  L of daily milk yield, parity = 3) were used. Ewes were milked at 0730 and 1930 h and fed twice daily (0830 and 1630 h) 1.5 kg of a concentrate mixture plus 2 kg of hay (see Table 1 for ingredients and chemical composition). Feeds were analyzed and the following major mycotoxins were not detectable: aflatoxin B1, B2, G1, and G2, ochratoxin A, deoxynivalenol (DON), 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin, fusarenon-X, diacetoxyscirpenol, neosolaniol, and zearalenone. Fresh water was available at all times.

After a 14-d adaptation period to the local environment and diet, ewes were divided in 4 treatment groups of similar milk production: Control, Aflatoxin (AF), YCW and AF+YCW groups. YCW extracts from *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026 were provided by Alltech Inc. (purity 90%, batch No 278 066, Nicholasville, KY, USA). The trial consisted of a 3-d, short-term exposure period followed by a 21-d, long-term exposure period (Figure 1). Each animal was fed a constant dose of AFB1-contaminated wheat at 60  $\mu\text{g/kg}$  of feed. Each daily dose of contaminated wheat was placed in 4 digestible gelatine capsules (1.5 g per capsule),

alone or in combination with YCW at a dose of 2 g/kg of feed in a 1:1 ratio (w/w), and orally administered with the help of a balling gun before the morning feeding. During both the short- and long-term exposure periods, ewes were placed in metabolic cages for sample collection. Individual daily feed intake and milk production were recorded. Ewes were inspected daily and their weights were recorded weekly. Milk samples were analyzed weekly for butyrate, protein, lactose and somatic cell count (SCC) by an external laboratory (CILAL, Theix, France).

### **Sample Collection**

Samples of milk, urine and feces were taken the day before the last mycotoxin administration and for 3 d thereafter. Milk samples (100 mL) were collected before (0 h) and 12, 24, 36, 48 and 72 h after the last dose. Milk was preserved by adding 200  $\mu$ L of a solution of sodium azide to reach a final concentration of 0.015 g/L and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Urine and feces excreted over 24-h periods were collected for 4 d and weighed. Urine was collected in a clean container containing sodium azide (0.5 g/L urine). A 50 mL sample was centrifuged ( $4000 \times g$ , 10 min), aliquoted (1.5 mL) in plastic tubes, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Feces were manually homogenized, and a representative sample of 50 g was transferred into a flask. Fecal samples were dried ( $50^{\circ}\text{C}$ , 72 h), ground through 0.5 mm mesh paper filter, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### **Aflatoxin Analysis**

**Sample extraction and clean up.** For urine, 2 mL were mixed with 1 mL of methanol and buffered to pH 7.4 with 9 mL of PBS. The mixture was centrifuged ( $4000 \times g$ , 10 min) and the whole supernatant was applied to an immunoaffinity column clean-up (IAC, Aflaprep M, R-biopharm, Lyon, France). The IAC column was then washed with water (10 mL), air dried and aflatoxins were eluted with methanol (1.5 mL) then water (0.5 mL). Fifty  $\mu$ L of eluate were injected into the HPLC system.

Ground feces (1 g) were suspended in 4 mL of 1% NaCl solution and extracted with 12 mL of chloroform. The mixture was centrifuged ( $4000 \times g$ , 10 min), and the organic layer (9 mL) was transferred into a clean tube where solvent was evaporated under a gentle stream of nitrogen gas at 50°C. The dried residue was first dissolved in 0.5 mL of methanol, then 10 mL of PBS at pH 7.4 was added. The solution was centrifuged ( $4000 \times g$ , 10 min), and the entire supernatant was loaded onto an IAC column (Aflaprep, R-biopharm, Lyon, France). Clean up procedure was performed as detailed above. Aflatoxins were first eluted with methanol (750  $\mu$ L) and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen gas at 50°C. A second elution was carried out successively with methanol (750  $\mu$ L) and water (250  $\mu$ L). Fifty  $\mu$ L of this solution were injected into the HPLC system.

For milk, AFM1 was determined using the official French method (NF EN ISO 1451) (Dragacci et al., 2001). Briefly, milk samples were thawed overnight at 4°C, filtered and loaded onto a IAC column (Aflaprep M, R-biopharm, Lyon, France), which was previously washed with 10 mL of distilled water. Aflatoxin M1 was eluted with 4 mL of acetonitrile. The eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen gas at 45°C and reconstituted with methanol (125  $\mu$ L) and water (375  $\mu$ L). Fifty  $\mu$ L of this solution were injected into the HPLC system. For each matrix, a validation of the analytical method was performed by analyzing replicates of quality control samples (QCS) at known concentrations. The following performance criteria: selectivity, linearity, precision and accuracy, as well as recovery and stability of AFB1 and AFM1 were checked and considered satisfactory for all tested matrices (Data not shown).

**HPLC Procedure.** The purified extracts were injected into a HPLC system (Gold 126 Solvent Module, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) equipped with an automatic injector (AS 3000, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) and a fluorescence detector (FL 3000, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The detection of aflatoxins was set at 366 nm

excitation and 438 nm emission. For each matrix, separation of aflatoxins was performed on a same reversed-phase C<sub>18</sub> (Nucleodur column, 150 mm × 4.6 mm) maintained at 40°C and fitted with a C<sub>18</sub> guard column supplied by Macherey-Nagel (Düren, Germany) by using an isocratic mobile phase (acetonitrile:methanol:water:acetic acid, 17.5:17.5:64:1), (acetonitrile:water, 25:75) and (isopropanol-acetonitrile-acetic acid-water, 10:10:2:78) set at 1 mL/min flow-rate for urine, milk and feces, respectively. For feces extracts, detection of AFB1 was improved by post-column derivatization with pyridinium bromide perbromide at 0.05 mg/mL (Garner et al., 1993).

### ***Toxicokinetics and Statistical Data Analyses***

Data on aflatoxins elimination in urine and feces were compared by non-parametric, one-way-analysis of variance (Mann Whitney test) (Aoudia et al., 2008). Data on body weight, DMI, milk production (milk yield, protein, fat concentration, and SCC) and milk AFM1 transfer parameters (concentration, output and carryover) were analyzed, using the MIXED procedure of SAS, with the following mixed linear model:  $y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + (T \times P)_{ij} + A(i)_k + \varepsilon_{ijk}$ , where  $y$  is the dependent variable;  $\mu$  is the overall mean;  $T$  is the fixed effect of the treatment;  $P$  is the fixed effect of the sampling period;  $T \times P$  is the treatment  $\times$  period interaction;  $A$  is the random effect of animal tested within treatment; and  $\varepsilon$  is the random residual. The SCC were divided by 1,000 and converted to the neperian logarithm before statistical analysis. All data were analyzed using the statistical software of SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC). All statements of statistical significance are based on a probability of  $P < 0.05$ . Trends are discussed at a statistical significance of  $P < 0.10$ .

## **RESULTS**

### ***Feed Intake, Body Weight and Milk Parameters***

Intake, body weight and milk production were used as generic indicators of the effect of aflatoxins and YCW treatments on ewes. The level of aflatoxins used in this study had no apparent effect on feed intake, body weight, or milk production or quality ( $P > 0.05$ ) (Table 2). Similarly, no differences were observed for YCW alone or combined with aflatoxins as compared with controls.

Independently of treatments, daily milk yield decreased by 50% throughout the experiment, whereas DMI and BW decreased 2.3 and 3.2%, respectively from beginning to the end of the experimental period ( $P > 0.01$ ). In view of the absence of effects on animal production parameters the treatments Control and YCW alone were not further considered.

### ***Aflatoxins Excretion after the Short-Term Exposure***

No aflatoxins were detectable in urine, feces and milk before administration of contaminated wheat. This finding was expected because ingredients of the ration were controlled for the absence of aflatoxins and other common mycotoxins.

After the 3-d administration, AFB1 and AFM1 were both recovered in feces at equivalent amounts. They reached their maximum value 24 h after the last administration and decreased to 25% 72 h post-inoculation (Figure 2). Addition of YCW increased by one fold the amount of AFB1 eliminated in feces collected before the last administration but this effect was not significant and not observed at other time points. Urinary excretion of AFM1 was also maximal 24 h after the last dose and decreased to nearly 10% 72 h post-inoculation. YCW slightly reduced the elimination of AFM1 in urine. In both groups (AF and AF+YCW) there was a noticeable individual variability between ewes evidenced by the high standard deviations of the average measures.

YCW administration decreased the concentration of AFM1 in milk ( $P < 0.05$ ; Table 3). AFM1 transfer into milk 24 h after the last dose decreased numerically with YCW supplementation of the contaminated diet. The concentration of AFM1 peaked at the first milking (12 h) and decreased to trace amounts 72 h after the last dose. Aflatoxin carryover and output were 0.54% and 1.024  $\mu\text{g}$ , respectively, in the AF group; these diminished to 0.40% and 0.760  $\mu\text{g}$ , respectively, in the AF+YCW group.

### ***Aflatoxins Excretion after the Long-Term Exposure***

The excretion levels of aflatoxins in both treatment groups after 21 d of administration were higher than the values obtained on the same animals after the short-term exposure (Figure 2). Recoveries reached up to 26.9  $\mu\text{g}$  AFB1 and 37.2  $\mu\text{g}$  AFM1 in feces and up to 10.7  $\mu\text{g}$  AFM1/d in urine. In addition, within each group there was less variation among individuals.

In contrast to the short-term exposure, there was a clear positive effect of YCW on fecal excretion patterns after the 21-d exposure. The presence of AFB1 and AFM1 was increased in the feces of the AF+YCW group ( $P < 0.05$ ), particularly for AFM1 which increased up to 100% compared with the AF group ( $P < 0.05$ ). This higher excretion of aflatoxins in feces was concomitant with a lower concentration of AFM1 in urine samples compared with concentrations observed in the AF group, although the differences were not significant. In contrast, YCW did not affect the level of AFM1 in milk (Table 3). Concentration profiles of AFM1 in milk and transfer parameters did not differ between AF and AF+YCW groups ( $P > 0.05$ ).

### ***Excretion Balance***

For the 3-d exposure, the cumulative amounts of aflatoxins excreted at 72 h post-treatment and expressed as AFB1 equivalents were 111 and 120  $\mu\text{g}$  for the AF and AF+YCW groups, respectively (Table 4). For the 21-d exposure the quantities increased to 135 and 186

µg for the AF and AF+YCW groups, respectively. This excretion balance provides an indication of the differences between the short- and long-term exposures but it should not be confused with toxin recovery since measures were performed after repeated daily doses. Less than one quarter of the recovered aflatoxins was excreted in urine, whereas the amount of AFM1 accumulated in milk did not exceed 1.7% of the total. The excretion balance in the presence of YCW was in agreement with changes observed during the clearance of toxins. The YCW treatment increased fecal excretion of aflatoxins ( $P < 0.05$ ) and tended to reduce AFM1 elimination in urine ( $P < 0.10$ ) during the 21-d exposure.

## **DISCUSSION**

Owing to the extent and importance of the mycotoxin problem, the European Union has recently added a new functional group to the technological feed additives category that specifically considers the use of products ‘that can suppress or reduce the absorption, promote the excretion of mycotoxins or modify their mode of action’ to improve the safety of feeds (UE/386/2009). YCW extracts have shown to bind aflatoxins and other mycotoxins in vitro (Ringot et al., 2007, Sabater-Vilar et al., 2007, Yiannikouris et al., 2003) and are being studied as feed additives for modulating the toxic effects of mycotoxins on farm animals including ruminants (Korosteleva et al., 2007, Matur et al., 2010).

Dietary inclusion of YCW has been shown to reduce AFB1 contents in liver of laying hens (Zaghini et al., 2005) and reduced AFM1 secretion in milk in dairy cows (Diaz et al., 2004). We recently showed that YCW increased mycotoxin fecal excretion while reducing plasma concentration in rats (Firmin et al., 2010). In contrast, in other works the same kind of additives did not reduce milk contamination (Kutz et al., 2009, Stroud, 2006, Waltman, 2008) or the presence of AF-albumin adducts in pigs’ plasma (Meissonnier et al., 2009). Because YCW forms complexes with aflatoxin molecules that may reduce the toxin absorption, the

main focus of this work was to test the capacity of a commercial YCW preparation to modify the excretion of AFB1 in feces, urine and milk in a dairy ewe model of ruminants. It should be noted that the contaminated feed used in this study also contained other aflatoxins, notably AFB2. We focused on AFB1 because it is the most common and most toxic food contaminant of the aflatoxins family. The main AFB1 metabolite, AFM1, was also monitored. There may exist other conjugated and oxidative forms of AFB1 but to our knowledge they have not been characterized in ruminants and they were not monitored. Aflatoxicol, another intermediate metabolite of AFB1, can be formed before or after absorption or transformed to other metabolites during transition in vivo (Wu et al., 2009) and was not monitored.

The daily intake levels of 60 µg AFB1 kg feed can be compared with the contamination level occasionally found in feeds intended for livestock (Pietri et al., 2004). It should be noted though, that this level was higher than levels legally allowed in dairy animal feeds in Europe (2002/32/CE) and North America (5 and 20 µg kg feed, respectively). The absence of effect on intake, BW and performance was expected as it was well below the lower toxic dose. The absence of negative effect was in agreement with the literature also (Battacone et al., 2003, Rao and Chopra, 2001).

To our knowledge, no recent studies report the excretion of AFB1 and AFM1 in the urine and feces of ruminants. Our results on AFB1 and AFM1 excretion profiles agree with the toxicokinetics described previously by other authors using radiolabelling and thin layer chromatography detection methods. Allcroft et al. (1967) obtained similar excretion patterns in a dairy cow after a single oral administration of AFB1 0.5 mg/kg BW with most of the excretion occurring within 48 h after administration.

In our study using a repeated dose design, the cumulative sum of AFB1 and AFM1 accounted for up to 100% of the daily dose at the end of the 3-d clearance period. As

previously stated, the repeated dose design is inadequate to calculate the mass balance. Previous investigators reported that after a single dose only 8 to 9% of the total AFB1 was recovered by urinary and fecal routes in ewes (Nabney et al., 1967), wethers (Armbrecht et al., 1970), or cows (Allcroft et al., 1967).

The addition of YCW to the contaminated diet enabled to reduce absorption of AFB1 in both the 3-d and 21-d exposure periods. During the long-term, 21-d exposure, the amount of AFM1 excreted into feces almost increased 2-fold in ewes fed the contaminated diet supplemented with the YCW extract compared with the group fed aflatoxins alone (Table 4). This increase in AFM1 in feces was associated with a tendency for lower urinary excretion. Other studies, using organic adsorbing agents and carried out on rats, indicated similar modifications in excretion patterns with an increase of AFM1 excreted in feces (Gratz et al., 2006). Gratz et al. suggested that AFM1 was formed in rat enterocytes and diffused back into the lumen of the digestive tract where it can bind to sequestering compounds. AFM1 in the feces of ewes that was confirmed by LC-MS/MS could be produced by the same mechanism since ruminants possess the necessary cytochrome P450 enzyme in the intestine but it also can come from hepatic biotransformation and subsequent enterohepatic circulation (Guerre et al., 1996, Larsson et al., 1994, Lynch, 1972). Although complementary studies will be needed to determine the origin of AFM1, in this experiment the increase in AFM1 excretion induced by YCW in the long-term exposure accounted for an important proportion of the total aflatoxin eliminated from the animal body.

Nevertheless, the increase in aflatoxin excretion in feces did not translate to a reduced AFM1 carryover in milk. The rate of carryover averaged 0.47% and 0.27% for the short- and long-term exposures, respectively. These values were similar to the 0.26% reported by Battacone et al. on ewes fed a similar dose but lower than the 0.12% reported by the same authors using a lower dose (Battacone et al., 2003). The carryover has been shown to increase

in high producing cows (Veldman et al., 1992) and the same may occur in ewes. Other reports have also identified milk yield as the main factor contributing to the variability of toxins excretion in lactating animals (Masoero et al., 2007). The ewes used in our study were in mid-lactation at the start of the trial and may be not a good experimental model to test the effect of mycotoxin-reducing additives on milk carryover. There was, however, a reduction of AFM1 concentration in ewes fed YCW during the short-term exposure when carryover was almost double than that recorded during the long-term exposure. Other studies on dairy cows, also reported the absence of effect of YCW on milk contamination (Kutz et al., 2009, Stroud, 2006).

The YCW preparation tested by us exclusively contained modified cell walls of *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026. This preparation has been demonstrated *in vitro* to adsorb AFB1 (Devegowda et al., 1998) without dissociating in ruminal fluid (Moschini et al., 2008) and under pH conditions close to those found within the digestive tract (Dawson et al., 2001, Diaz et al., 2002). The results observed in this trial with ewes also suggest that binding is the mechanism reducing aflatoxin absorption in the gastrointestinal tract of ruminants since no other effect on productions parameters was observed related to the use of YCW alone in the diet.

## **CONCLUSION**

A modified yeast cell wall extract changed the excretion balance of aflatoxins contaminated feed fed to dairy ewes. The amount of aflatoxin B1 and its derivative aflatoxin M1 eliminated in feces increased, whereas aflatoxin M1 in urine tended to decrease. The observed increase in aflatoxin elimination in feces is a direct indication that aflatoxin absorption was impaired and suggests that dietary supplementation with this yeast cell wall extract could protect ruminants against the toxic effects of aflatoxins in feed.

## ACKNOWLEDGMENTS

S. Firmin was supported by a doctoral fellowship (CIFRE 1058/2007) jointly financed by Alltech and ANRT (Association Nationale de la Recherche Technique, France). The authors greatly thank J.P. Jouany for helpful discussions during the experimental set up, C. Mathevon and the staff of the animal experimental facilities of the INRA's Herbivores Research Unit for animal care as well as D. Alvarez for help in sample analysis.

## REFERENCES

- Allcroft, R., B. A. Roberts, and W. H. Butler. 1967. Aflatoxin in milk. *Food Cosmet. Toxicol.* 5:597-598.
- Aoudia, N., E. K. Tangni, and Y. Larondelle. 2008. Distribution of ochratoxin A in plasma and tissues of rats fed a naturally contaminated diet amended with micronized wheat fibres: Effectiveness of mycotoxin sequestering activity. *Food Chem. Toxicol.* 46:871-878.
- Armbrecht, B. H., W. T. Shalkop, L. D. Rollins, A. E. Pohland, and L. Stoloff. 1970. Acute Toxicity of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Wethers. *Nature* 225:1062-1063.
- Battacone, G., A. Nudda, A. Cannas, A. C. Borlino, G. Bomboi, and G. Pulina. 2003. Excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Dairy Sci.* 86:2667-2675.
- Chowdhury, S. R., T. K. Smith, H. J. Boermans, and B. Woodward. 2005. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of turkeys. *Poult. Sci.* 84:1698-1706.
- Dawson, K. A., J. Evans, and M. Kudupoje. 2001. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations. Pages 169-181 in *Biotechnology in the*

- feed industry. T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Devegowda, G., M. V. L. N. Raju, A. Nazar, and H. V. L. N. Swamy. 1998. Mycotoxin picture worldwide: novel solutions for their counteraction. Pages 241-255 in Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium: passport to the year 2000. T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed. Nottingham University Press.
- Diaz-Llano, G. and T. K. Smith. 2006. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts. *J. Anim. Sci.* 84:2361-2366.
- Diaz, D. E., W. M. Hagler, Jr., J. T. Blackwelder, J. A. Eve, B. A. Hopkins, K. L. Anderson, F. T. Jones, and L. W. Whitlow. 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157:233-241.
- Diaz, D. E., W. M. Hagler, Jr., B. A. Hopkins, and L. W. Whitlow. 2002. Aflatoxin binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* 156:223-226.
- Dragacci, S., F. Grosso, and J. Gilbert. 2001. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 84:437-443.
- Firmin, S., P. Gandia, D. P. Morgavi, G. Houin, J. P. Jouany, G. Bertin, and H. Boudra. 2010. Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27:1153-1160.

- Garner, R. C., M. M. Whattam, P. J. L. Taylor, and M. W. Stow. 1993. Analysis of United Kingdom purchased spices for aflatoxins using an immunoaffinity column clean-up procedure followed by high-performance liquid chromatographic analysis and post-column derivatization with pyridinium bromide perbromide. *J. Chromatogr. A* 648:485-490.
- Gratz, S., M. Taubel, R. O. Juvonen, M. Viluksela, P. C. Turner, H. Mykkanen, and H. El-Nezami. 2006. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7398-7400.
- Guerre, P., Galtier, and V. Burgat. 1996. Animal aflatoxicosis: From clinical observations to mechanisms of action. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* 147:497-518.
- Huwig, A., S. Freimund, O. Kappeli, and H. Dutler. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122:179-188.
- Jouany, J. P. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:342-362.
- Kabak, B., A. D. Dobson, and I. Var. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:593-619.
- Korosteleva, S. N., T. K. Smith, and H. J. Boermans. 2007. Effects of feedborne *Fusarium* mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:3867-3873.
- Kutz, R. E., J. D. Sampson, L. B. Pompeu, D. R. Ledoux, J. N. Spain, M. Vazquez-Anon, and G. E. Rottinghaus. 2009. Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B1. *J. Dairy Sci.* 92:3959-3963.

- Larsson, P., L. Busk, and H. Tjalve. 1994. Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH conjugation of aflatoxin B1 in sheep. *Carcinogenesis* 15:947-955.
- Lynch, G. P. 1972. Mycotoxins in feedstuffs and their effect on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 55:1243-1255.
- Masoero, F., A. Gallo, M. Moschini, G. Piva, and D. Diaz. 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal* 1:1344-1350.
- Matur, E., E. Ergul, I. Akyazi, E. Eraslan, and Z. T. Cirakli. 2010. The effects of *Saccharomyces cerevisiae* extract on the weight of some organs, liver, and pancreatic digestive enzyme activity in breeder hens fed diets contaminated with aflatoxins. *Poult. Sci.* 89:2213-2220.
- Meissonnier, G., I. Raymond, J. Laffitte, A. Cossalter, P. Pinton, E. Benoit, G. Bertin, P. Galtier, and I. Oswald. 2009. Dietary glucomannan improves the vaccinal response in pigs exposed to aflatoxin B1 or T-2 toxin. *World Mycotoxin J.* 2:161-172.
- Morgavi, D. P., H. Boudra, and J. P. Jouany. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. in *Mycotoxins in Farm Animals*. I. P. Oswald and I. Taranu, ed. Transword Research Network, Kerala, India.
- Moschini, M., A. Gallo, G. Piva, and F. Masoero. 2008. The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:292-309.
- Nabney, J., M. B. Burbage, R. Allcroft, and G. Lewis. 1967. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion pattern in the lactating ewe. *Food Cosmet Toxicol* 5:11-17.
- Niderkorn, V., H. Boudra, and D. P. Morgavi. 2007. Les fusariotoxines: comment limiter leur presence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants? *Fourrages* 189:111-123.

- Pietri, A., T. Bertuzzi, L. Pallaroni, and G. Piva. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 21:479-487.
- Prandini, A., G. Tansini, S. Sigolo, L. Filippi, M. Laporta, and G. Piva. 2009. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.* 47:984-991.
- Rao, S. B. N. and R. C. Chopra. 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M1 excretion in milk of goats. *Small Rumin. Res.* 41:203-213.
- Ringot, D., B. Lerzy, K. Chaplain, J.-P. Bonhoure, E. Auclair, and Y. Larondelle. 2007. In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: Comparison of isotherm models. *Bioresour. Technol.* 98:1812-1821.
- Sabater-Vilar, M., H. Malekinejad, M. H. Selman, M. A. van der Doelen, and J. Fink-Gremmels. 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia* 163:81-90.
- Shetty, P. H. and L. Jespersen. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci. Technol.* 17:48-55.
- Stroud, J. S. 2006. The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. M. Sc. Thesis. North Carolina State University. Raleigh.
- Veldman, A., J. A. C. Meijjs, G. J. Borggreve, and J. J. Heeres van der Tol. 1992. Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Anim. Prod.* 55:163-168.
- Waltman, L. 2008. Effect of sequestering agents on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. M. Sc. Thesis. North Carolina State University. Raleigh.
- Wu, Q., A. Jezkova, Z. Yuan, L. Pavlikova, V. Dohnal, and K. Kuca. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab. Rev.* 41:1-7.

Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004. Adsorption of zearalenone by  $\beta$ -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* 67:1195-1200.

Yiannikouris, A., L. Poughon, X. Cameleyre, C. G. Dussap, J. Francois, G. Bertin, and J. P. Jouany. 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotech. Lett.* 25:783-789.

Zaghini, A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli, and L. Rizzi. 2005. Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver. *Poult. Sci.* 84:825-832.

**Table 1.** Ingredients and nutrient composition of the ration fed to the lactating dairy ewes

---

Ingredient, % of DM	
Wheat grain	23.3
Soybean meal	15.3
Prairie hay	56.2
Chemical composition, g/kg	
DM	87.0
Ash	5.0
NDF	35.7
ADF	16.3
Starch	14.1
Ca	2.5
P	2.7

---

**Table 2.** Body weight (BW), dry matter intake (DMI), and milk production and composition in dairy ewes fed a daily dose of aflatoxins (AF)-contaminated feed, modified yeast cell walls extracts (YCW), and their combination throughout the 4-week experimental period.

Production parameters <sup>1</sup>	Treatments				SEM	<i>P</i> -value <sup>3</sup>		
	Control	YCW	AF	AF+YCW		T	P	T x P
BW (kg)	67.8	70.3	64.8	62.4	6.73	0.3550	<0.0001	0.9894
DMI (kg)	2.79	2.85	2.79	2.85	0.1708	0.4050	<0.001	0.4166
Milk (L/d)	1.2	1.0	1.3	1.4	0.25	0.2193	<0.0001	1.0000
Fat (g/kg)	82.8	79.3	74.8	80.9	5.40	0.4982	0.0948	0.6558
Protein (g/kg)	63.2	62.0	70.9	62.6	7.07	0.4984	<0.001	0.5994
Lactose (g/kg)	49.3	48.6	46.8	50.1	5.40	0.4982	0.0948	0.6558
SCC <sup>2</sup>	6.1	6.0	6.1	5.7	1.25	0.9414	0.2256	0.2218

<sup>1</sup>Mean values of each treatment group (n = 4) before and during the short- and long-term exposure periods.

<sup>2</sup> Neperian logarithmic value of somatic cell count per  $\mu\text{L}$  of milk

<sup>3</sup>T = treatment; P = period; T x P = treatment x period interaction

**Table 3.** Aflatoxin M1 (AFM1) transfer in milk of ewes at the last dose of the short-term (3 days) and long-term (21 days) exposure to aflatoxins (AF)-contaminated diet alone or with modified yeast cell walls extracts (YCW).

	Short-term exposure		Long-term exposure		SEM	T	<i>P</i> -Value <sup>5</sup>	
	AF	AF+YCW	AF	AF+YCW			P	T x P
Milk yield <sup>1</sup> (L)	1.2	1.4	0.9	1.0	0.25	0.2554	<0.05	0.537
Output <sup>2</sup> (μg)	1.024	0.760	0.457	0.560	0.2865	0.2622	<0.05	0.0583
Concentration (ng/L)	861	544*	520	552	194.3	0.2622	0.0668	0.0583
Carry over <sup>3,4</sup> (%)	0.54	0.40	0.24	0.30	0.150	0.6233	0.0191	0.1839

<sup>1</sup> Mean volume produced 24 h post dosing

<sup>2</sup> Mean AFM1 excreted 24 h post dosing

<sup>3</sup> Expressed in terms of AFB1 equivalents according to:  $MW\ AFB1 / MW\ AFM1 (312.3/323.3) \times \mu g\ AFM1$

<sup>4</sup> % calculation based on a daily dose intake of 180μg AFB1 /d /head

<sup>5</sup> T = treatment; P = period; T x P = treatment x period interaction

\*  $P < 0.05$  between AF and AF+YCW treatments within each row and exposure time

**Table 4.** Cumulative excretion of aflatoxin B1 (AFB1) and aflatoxin M1 (AFM1) ( $\mu\text{g}$ , mean  $\pm$  SD) in ewes fed aflatoxins (AF)-contaminated diet alone or with modified yeast cell walls extracts (YCW) for a short-term (3 days) and long-term (21 days) exposure.

Mycotoxin <sup>1</sup>	Matrix	Short-term exposure		Long-term exposure	
		AF	AF+YCW	AF	AF+YCW
AFM1	Milk	1.9 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.5	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.4
	Urine	17.8 $\pm$ 2.5	15.4 $\pm$ 7.7	26.5 $\pm$ 7.6	16.1 $\pm$ 6.3 <sup>†</sup>
	Feces	57.0 $\pm$ 7.3	49.1 $\pm$ 11.3	57.2 $\pm$ 12.1	98.3 $\pm$ 16.6*
AFB1	Feces	41.7 $\pm$ 9.9	58.1 $\pm$ 7.9*	56.1 $\pm$ 4.1	76.9 $\pm$ 8.7*
Sum <sup>2</sup>	Urine+Milk	17.9 $\pm$ 2.4	15.4 $\pm$ 7.1 <sup>†</sup>	25.7 $\pm$ 7.3	15.9 $\pm$ 6.1 <sup>†</sup>
	Feces	96.0 $\pm$ 17.3	104.7 $\pm$ 17.2	109.2 $\pm$ 16.0	170.4 $\pm$ 20.9*
	Total output	111.1 $\pm$ 9.7	120.2 $\pm$ 23.6	134.9 $\pm$ 20.7	186.3 $\pm$ 21.0

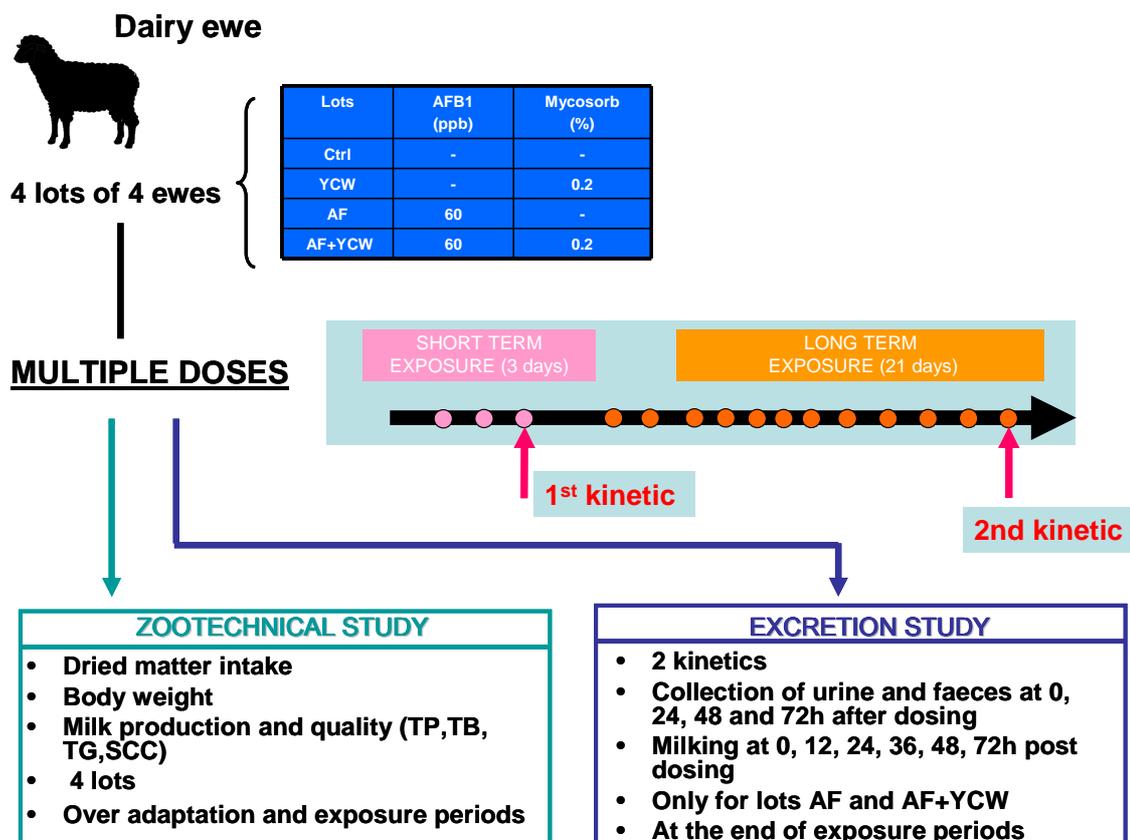
<sup>1</sup> Excreted during 24 h before and 72 h after the last dose

<sup>2</sup> Expressed in terms of AFB1 equivalents according to:  $MW \text{ AFB1} / MW \text{ AFM1} (312.3/323.3) \times \mu\text{g AFM1}$

<sup>†</sup>  $P < 0.10$  between AF and AF+YCW treatments within each row and exposure time

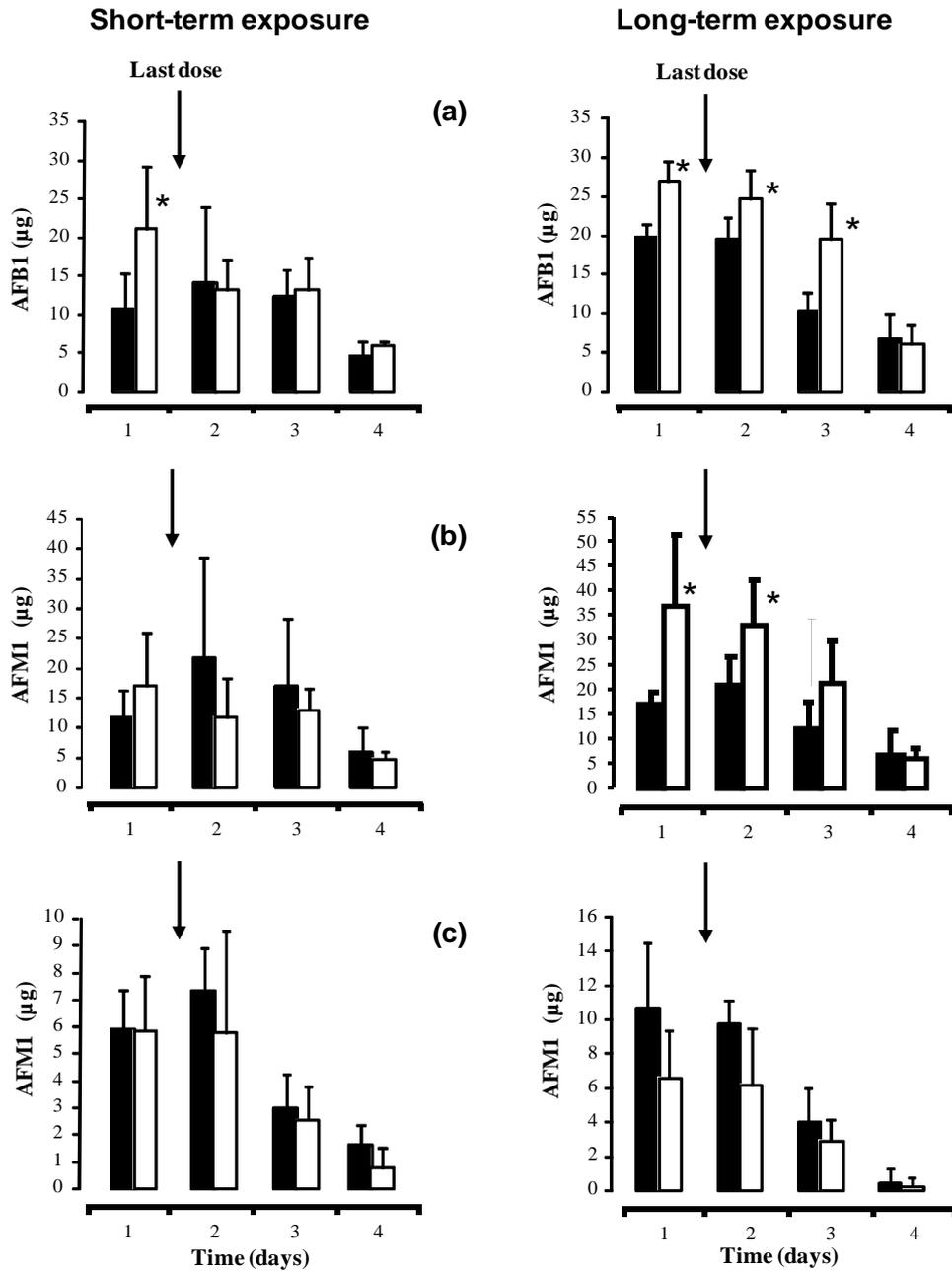
\*  $P < 0.05$  between AF and AF+YCW treatments within each row and exposure time

**Figure 1.** Protocol design of the study



Firmin. Figure 1

**Figure 2.** Daily excretion of Aflatoxin B1 (AFB1) in feces (a), Aflatoxin M1 (AFM1) in feces (b) and AFM1 in urine (c) of ewes measured the day before and for 3 d after the last dose of aflatoxin-contaminated wheat with (filled bars) or without (open bars) modified yeast cell wall extracts for a short-term (3 days) and long-term (21 days) exposure. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of 4 ewes. \* indicate  $P < 0.05$  between treatments for same day.



Firmin. Figure 2

## **DISCUSSION GENERALE**

Une grande diversité de mycotoxines de structures et d'origines variées, peut être présente dans l'alimentation des ruminants. L'exposition à ces composés chimiques joue vraisemblablement un rôle sur la santé animale, en liaison avec une toxicité chronique, sans manifestations cliniques précises et qui demeure aujourd'hui encore mal caractérisée quant aux conséquences sur le moyen et le long terme.

Des traitements de détoxification basés sur l'ajout d'adsorbants organiques ont été développés pour réduire les risques posés par les mycotoxines et renforcer les moyens de prévention disponibles. Leur utilisation est préconisée dans les systèmes d'élevage intensifs ou les risques liés à la consommation d'aliment contaminé sont importants.

Cependant, les travaux réalisés jusqu'à présent pour évaluer l'effet protecteur de ces produits vis-à-vis de l'exposition aux mycotoxines sont globalement insuffisants. De grandes disparités peuvent être observées dans l'efficacité d'un adsorbant selon que l'évaluation soit conduite *in vitro* ou qu'elle soit menée *in vivo* sur un modèle animal monogastrique ou ruminant. Le ruminant étant moins sensible aux mycotoxines que les autres espèces de ferme, les performances de ces traitements adsorbants ne peuvent généralement pas s'apprécier par des mesures indirectes (EFSA, 2009). Les conclusions issues des études zootechniques et toxicologiques restent relativement imprécises et souvent peu consistantes (réponse faible ou nulle) (Korosteleva et al., 2007, Martin et al., 2010).

Afin de pouvoir mesurer l'efficacité réelle d'un adsorbant à réduire la biodisponibilité des mycotoxines chez le ruminant, il est indispensable de porter les efforts d'évaluation sur l'analyse toxicocinétique des mycotoxines (EFSA, 2009). Dans la littérature scientifique, le transfert d'AFM1 dans le lait est souvent le seul paramètre d'évaluation utilisé chez le ruminant laitier. Cependant cet indicateur peut présenter des limites. Les taux de mycotoxines excrétés dans le lait sont faibles, variables entre individus, d'une traite à l'autre (Fink-Gremmels, 2008a). Aussi les paramètres sanguins comme l'*AUC*, la *Cmax* et la balance d'excrétion sont de plus en plus utilisés pour caractériser l'efficacité des adsorbants organiques *in vivo* (Aoudia et al., 2009, Aoudia et al., 2008). Il semblait donc original d'approfondir l'évaluation chez le ruminant en comparant les taux de mycotoxines circulantes et excrétées dans l'urine et les fèces d'animaux exposés avec et sans adsorbant organique. Aussi, nous avons utilisé une préparation commerciale d'extraits de parois modifiées de levures dont l'évaluation par ces critères demeurerait à ce jour incomplète.

C'est donc sur la base du constat d'un manque de connaissances concernant les effets des adsorbants organiques sur l'absorption digestive des mycotoxines que notre travail de

recherche a été initié. La conduite des études cinétiques avait pour objectif de tester l'intérêt prophylactique de l'addition de la préparation en supplément dans le régime alimentaire du ruminant. Pour atteindre cet objectif de thèse, nous nous sommes attachés à développer deux modèles expérimentaux permettant d'approcher les conditions réelles d'application des agents adsorbants.

Nous avons utilisé un premier modèle expérimental pour apporter une preuve de l'efficacité de l'adsorbant par la mesure de la balance d'excrétion et le calcul des paramètres toxicocinétiques. Le rat est apparu comme un choix pratique et économique qui répondait aux besoins d'une évaluation menée par des critères purement toxicocinétiques. C'est aussi un modèle animal qui permet de s'affranchir des contraintes liées à la manipulation de substances radioactives chez les animaux de ferme (achats des mycotoxines radiomarquées et gestion de l'élimination des déchets radioactifs coûteux, risque d'exposition du manipulateur).

Nous avons développé un second modèle expérimental pour valider la preuve du concept chez le modèle ruminant. La brebis laitière présente des caractéristiques qui en font un modèle animal souvent utilisé pour évaluer l'efficacité des agents organiques candidats à la détoxification des mycotoxines chez le ruminant par les paramètres spécifiques (Battacone et al., 2009, Blank and Wolfram, 2009). De plus, la brebis est un animal cible des mycotoxines, qui, avec le bovin est élevée pour ses aptitudes de production laitière. Sa spécialisation laitière et l'intensification des productions amènent à une conduite de troupeau centrée sur une production hivernale importante en bergerie. L'animal est de ce fait particulièrement exposé aux mycotoxines de conservation en période de stabulation compte tenu de la composition de son régime alimentaire en fourrages et en concentrés. Comme pour les autres races laitières, la maîtrise de la contamination du lait de brebis par les aflatoxines et les ochratoxines s'inscrit dans les enjeux actuels de sécurité alimentaire du consommateur. Les études cinétiques et zootechniques menées sur cet animal permettent donc une interprétation, sans extrapolation, de l'applicabilité de l'adsorbant testé comme agent de détoxification des mycotoxines.

Le produit commercial que nous avons testé a été incorporé dans la ration aux taux d'inclusion recommandés par le fournisseur (0.5 à 2g/kg d'aliment). Les modalités d'administration des mycotoxines utilisées dans nos études expérimentales ont été choisies pour reproduire le plus fidèlement possible l'exposition des animaux de ferme par une alimentation contaminée. Chez le rat, les doses d'AFB1 et d'OTA administrées ont été calculées sur la base des concentrations maximales tolérées dans l'alimentation animale par la législation européenne (2002/32/CE et 2006/576/CE). Ces doses sont équivalentes, en mg par

kg de PV à la quantité que peuvent ingérer les animaux à la ferme dans les conditions normales de production. Chez la brebis laitière, les doses d'AFB1 administrées sont supérieures aux limites établies par l'union européenne mais restent en dessous de la dose journalière tolérée proposée par la Food and Drug Administration (FDA, USA). Elles sont comparables avec des niveaux exceptionnels de contamination relevés dans l'alimentation du bétail en Europe (Pietri et al., 2004). Les doses que nous avons administrées sont très faibles et correspondent à des niveaux d'exposition considérés comme dépourvus d'effets toxiques (< 100 fois la DL<sub>50</sub> des animaux). Ainsi les fréquences d'exposition (simples, répétées) appliquées dans nos protocoles d'études n'ont pas permis de caractériser les effets toxiques des mycotoxines, par l'apparition de troubles cliniques ou par la baisse des performances zootechniques.

Les plans expérimentaux relatifs à l'évaluation de l'efficacité des agents de détoxification de mycotoxines sont particulièrement contraignants chez le ruminant en lactation (ressources humaines, gestion du cycle de production). A ces contraintes s'ajoutent celles liées à la conduite d'essais combinant des mesures zootechniques et toxicocinétiques (nombre d'animaux, prélèvements, contrôle sanitaire). Dans le cadre expérimental que nous avons choisi, il a également fallu prendre en compte la variabilité animale dont la part contributive à la variabilité globale des résultats est importante. Pour limiter cette variabilité, il aurait été nécessaire de travailler en dispositif carré latin, avec le même animal recevant successivement les quatre régimes alimentaires testés au cours de l'évaluation. Bien que techniquement réalisable, cela entraîne des complications expérimentales (longues périodes de mesures) de sorte qu'un dispositif en carré latin n'a pas pu être mis en place. Nous avons du travailler en lot (4x4 animaux). Pour obtenir la même puissance statistique qu'un carré latin, il aurait fallu augmenter considérablement le nombre d'animaux, ce qui aurait été difficilement gérable car le personnel technique et le coût des analyses deviennent très vite des facteurs limitants. Afin de tenir compte à la fois des contraintes humaines, économiques et statistiques, il a été nécessaire de réaliser un compromis aboutissant à des résultats souvent en limite du seuil de signification statistique.

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse ont été principalement discutés séparément pour chaque modèle expérimental. Dans ce dernier chapitre, nous proposons une autre approche. Nous nous attacherons à discuter des résultats par paramètre, d'abord les paramètres toxicocinétiques puis les paramètres zootechniques amenant ainsi à nous

interroger sur la pertinence de l'application de la paroi de levure testée dans l'alimentation des animaux d'élevage.

## **I. LA MESURE DES PARAMETRES SPECIFIQUES**

### **A. L'effet de la paroi de levure sur les teneurs des mycotoxines dans les fèces et l'urine**

Les études cinétiques réalisées sur les deux modèles animaux ont montré que l'administration de la paroi de levure entraîne une augmentation significative de l'excrétion fécale de l'AFB1 et dans une moindre mesure celle de l'OTA.

Les essais sur le modèle rat, à l'aide de toxines marquées au tritium, ont permis de constater l'effet de la paroi de levure sur l'excrétion globale des deux mycotoxines et de leurs métabolites. L'étude menée chez la brebis était l'occasion de vérifier que l'addition de la paroi de levure affecte en particulier l'excrétion de l'AFB1 et de l'AFM1.

Concernant l'exposition à l'AFB1, l'effet observé dans les fèces s'accompagne au niveau urinaire de la diminution des taux excrétés. Par contre, nous n'avons pas observé d'effets de la paroi de levure sur l'excrétion urinaire dans le cas de l'exposition à l'OTA.

L'absence d'effet sur l'excrétion urinaire pourrait être imputable aux mécanismes d'élimination de l'OTA. La filtration glomérulaire joue un rôle important dans la clairance de la toxine. Elle peut s'accompagner d'une sécrétion suivie d'une réabsorption tubulaire (Dahlmann et al., 1998), ce qui aurait pu retarder l'excrétion et limiter l'effet de la paroi de levure sur les concentrations urinaires.

A notre connaissance, aucune étude n'a reporté l'effet des parois de levure par l'étude de la balance d'excrétion des aflatoxines, ce qui constitue le point fort de notre travail de thèse. Une étude antérieure conduite chez le rat exposé à 1.5 mg d'AFB1/kg de PV a montré l'amélioration de l'excrétion fécale de l'AFB1 et de l'AFM1 par la supplémentation en bactéries lactiques mais chez ces animaux, le taux d'AFM1 dans l'urine n'était pas diminué (Gratz et al., 2006). Nos résultats vont donc plus en avant dans la caractérisation de l'efficacité *in vivo* d'un adsorbant organique de l'AFB1 puisque les effets sur l'excrétion sont observés à des niveaux d'exposition beaucoup plus faibles et sont répétables d'une espèce animale à une autre.

Les effets de la paroi de levure sur l'excrétion de l'OTA sont aussi cohérents avec les résultats de Aoudia et al., (2008) et de Kerkadi et al., (1998) démontrant la capacité des FBM ou de la cholestyramine à réduire la biodisponibilité de l'OTA chez le rat.

**Quelque soit le modèle expérimental considéré, les effets de l'addition de la paroi de levure sur les paramètres d'excrétion des mycotoxines sont la conséquence d'une réduction de l'exposition de l'organisme.**

## **B. L'effet de la paroi de levure sur les teneurs des mycotoxines dans le sang et le plasma**

Nous avons observé que l'apport de parois de levure n'a entraîné aucun effet sur les demi-vies d'élimination et les pentes d'élimination des mycotoxines, celles-ci étant comparables à celles qui ont déjà été publiées chez le rat après administration *p.o* de 2,5 mg d'OTA /kg de PV (Coulombe and Sharma, 1985) et 600 µg d'<sup>3</sup>H]-AFB1 /kg de PV (Galtier et al., 1979). La réduction de l'exposition des animaux traités avec la paroi de levure ne peut donc pas s'expliquer par l'augmentation de l'élimination des mycotoxines.

L'étude cinétique a néanmoins montré que l'AFB1 dans le sang et le plasma apparaissait à des concentrations significativement plus faibles en présence de la paroi de levure que lorsque la toxine était administrée seule. La co-administration de la paroi de levure a entraîné une diminution des *AUC* et des *Cmax* aux deux concentrations d'AFB1 choisies indiquant une réduction de son absorption.

Les effets sur les paramètres toxicocinétiques de l'AFB1 sont à mettre en parallèle avec plusieurs observations faites chez le rat avec d'autres agents adsorbants organiques (FBM) et minéraux (cholestyramine) décrivant une réduction de l'absorption de l'OTA par une réduction des concentrations plasmatiques (Aoudia et al., 2008, Kerkadi et al., 1998).

Les effets de la paroi de levure sur les concentrations sanguines ou plasmatiques sont cohérents avec ceux observés sur l'excrétion fécale et urinaire des mycotoxines. Les différences ne sont pas dose-dépendantes et l'effet sur les paramètres sanguins (*Cmax* et *AUC*) sont moins marqués chez les animaux exposés à l'OTA.

Dans le cas de l'OTA, il apparaît que la concentration plasmatique, soit restée équivalente que la toxine soit administrée seule, ou en association avec la paroi de levure. Chez les espèces monogastriques, l'OTA peut subir un cycle entéro-hépatique par sécrétion

biliaire suivi d'une réabsorption intestinale (Roth et al., 1988). Elle peut également s'accumuler dans les organes notamment les reins. La conjonction de ces mécanismes aurait pu favoriser la redistribution systémique de l'OTA vers différents tissus et expliquer que l'addition de la paroi de levure n'a pas induit d'effet plasmatique.

**A partir des résultats de l'analyse non compartimentale, ajoutée aux données d'excrétion fécale et urinaire, on peut émettre l'hypothèse que la raison la plus probable conduisant à une exposition et une absorption plus faible des mycotoxines chez les animaux supplémentés en parois de levure est liée à l'étape d'absorption et non aux autres étapes de la cinétique.**

L'effet de l'apport de parois de levure sur les paramètres sanguins n'a été abordé que chez le modèle rat. Une méthode de quantification d'AFM1 et d'AFB1 dans le plasma de brebis a été testée indiquant la faible représentativité des ces toxines. L'AFM1 était la seule toxine détectée dans les conditions analytiques utilisées. En accord avec la description faite par Moschini et al., (2006) chez la vache, aucun pic d'absorption n'a été observé dans les 48h après arrêt du traitement (**Figure 14**). L'incapacité de déterminer la *C<sub>max</sub>* nous a conduits à abandonner le suivi des concentrations plasmatiques en AFM1.

Toutefois, l'effet de la paroi de levure sur l'excrétion de l'AFB1 étant reproductible du modèle monogastrique au modèle ruminant, on peut supposer que la modification des profils d'excrétion chez la brebis sont associés à une réduction de la fraction orale absorbée et du taux de mycotoxines circulant. Cette supposition nécessiterait d'être confirmée par des investigations supplémentaires en utilisant d'autres marqueurs d'exposition.

### **C. L'effet de la paroi de levure sur les teneurs des mycotoxines dans le lait**

Dans notre étude, les teneurs en AFM1 du lait que nous avons mesurées chez les brebis supplémentées en parois de levure étaient comparables à celles mesurées chez les brebis témoins quelle que soit la durée d'exposition imposée.

Les mesures d'excrétion dans les laits sont en accord avec les données reportées par Battacone et al., (2005). Nos résultats sont comparables aux taux de transfert (552 ng/L et 0.24% vs 596 ng/L soit 0.26% de la dose reçue dans l'étude antérieure) et aux profils

d'excrétion chez la brebis laitière après 7 jours d'exposition à de l'AFB1 (120 µg/animal/jour). Les taux d'AFM1 mesurés sont également conformes avec le modèle de prédiction<sup>3</sup> proposé par Battacone et al., (2003) pour une dose journalière administrée de 180 µg d'AFB1. Ces taux dépassaient 11 et 22 fois les teneurs réglementaires fixées pour le lait et le lait du nourrisson<sup>4</sup> à l'exception du groupe contrôle qui présentait des taux 17 et 34 fois supérieurs aux normes européennes après 3 jours d'exposition.

L'absence d'effet de la paroi de levure chez la brebis sur l'excrétion de l'AFM1 dans le lait est en accord avec des observations antérieures faites chez la vache laitière, confirmant l'inefficacité de cette préparation à réduire la contamination de la production laitière chez le ruminant (Stroud, 2006).

Il est néanmoins important de préciser que les plans expérimentaux mis en œuvre pour aborder ce paramètre sont très variables (espèce, race, composition de la ration, mode de distribution de l'additif). Les taux mesurés sont difficilement comparables entre essais. La concentration de l'AFM1 dans le lait dépend du taux d'AFB1 absorbé lequel peut être influencé par différents facteurs comme la quantité de toxine ingérée (Frobish et al., 1986, Polan et al., 1974) ou l'activité de digestion du rumen (Pulina et al., 2006). Cette variabilité est observée lorsque des brebis en lactation reçoivent la même dose d'AFB1 et sont adaptées à des régimes différents (Battacone et al., 2003, Battacone et al., 2005). Plus récemment, d'autres auteurs ont montré que la forme de l'adsorbant (en poudre ou en granulé) peut modifier le taux d'AFM1 excrété dans le lait (Masoero et al., 2009).

Il est donc difficile, à partir de la littérature, d'extrapoler les données et d'expliquer pourquoi l'effet de l'addition de la paroi de levure sur l'excrétion d'aflatoxines dans les fèces et l'urine ne s'est pas accompagné d'une baisse du taux d'AFM1 dans le lait chez la brebis. Il est probable que l'effet de la paroi de levure sur les paramètres d'excrétion du lait ait été atténué dans les conditions expérimentales de notre étude. La production de lait des animaux n'était pas maximale. D'autre part, les taux d'AFM1 mesurés dans le lait étaient comparables après 3 et 21 jours d'exposition alors qu'ils avaient augmentés dans l'urine et les fèces avec l'allongement de l'exposition. Ces observations suggèrent que des mécanismes de régulations ont pu limiter le transfert de l'AFM1 du plasma au lait et limiter l'effet de la paroi de levure sur ce paramètre. Cette hypothèse s'appuie sur l'existence de mécanismes de transports actifs et passifs au niveau de l'épithélium de la glande mammaire (**Figure 15**). Le transport passif

<sup>3</sup>AFM1 (µg/L) = -0.0043 + 0.00136 AFB1 (µg/jour)

<sup>4</sup>50 ng/ L de lait et 25 ng/L de lait pour nourrisson selon la Directive européenne 98/53/CE

explique qu'une relation linéaire existe entre la production de lait et l'excrétion d'AFM1 chez l'animal en lactation et qu'un animal à haut rendement de production peut excréter plus d'aflatoxines qu'un animal faiblement producteur de lait (Masoero et al., 2007). Le transport actif entraîne un relargage des aflatoxines dans le lait (van Herwaarden and Schinkel, 2006, van Herwaarden et al., 2006) et pourrait contribuer à diminuer la perméabilité du tissu mammaire à l'AFM1 observé chez l'animal évoluant vers le stade terminal de lactation (Lafont et al., 1983).

**Une autre point marquant de nos travaux de thèse aura été de montrer que la paroi de levure peut être à la fois efficace pour protéger des animaux d'une exposition alimentaire à de l'AFB1 et limitée pour prévenir la contamination de leur production laitière.**

#### **D. Les effets toxicocinétiques peuvent-ils s'expliquer par la séquestration des mycotoxines ?**

Un composé capable de séquestrer les mycotoxines dans le TGI de l'animal doit entraîner une réduction de leur absorption et faciliter leur élimination par la voie fécale. Les résultats présentés dans ce travail de thèse sont en accord avec ce principe toxicocinétique. Cependant, si les mesures des paramètres toxicocinétiques sanguins et du bilan d'excrétion sont des indicateurs fiables pour évaluer la capacité d'un composé à réduire l'absorption digestive d'un xénobiotique, ils ne permettent pas d'en caractériser la cause. Une excrétion biliaire facilitée ou un changement du métabolisme hépatique peuvent produire les mêmes effets sur l'absorption et l'excrétion d'un xénobiotique, notamment les mycotoxines (Groopman et al., 2008, Guarisco et al., 2008).

L'absorption d'un xénobiotique peut être affectée par un effet physiologique local au niveau du TGI, des retards de vidange gastrique, la perturbation de la flore et de la sécrétion d'enzymes digestives, des changements de la perméabilité de l'intestin grêle, de la motilité et du pH gastro-intestinal. L'administration de la préparation de paroi de levure aurait pu entraîner l'un de ces changements physiologiques provoquant des modifications du profil d'absorption et d'excrétion de l'AFB1 et de l'OTA. Aux doses administrées, on aurait pu

s'attendre à des effets liés à l'acidité de la paroi de levure testée (Moschini et al., 2008) ou à sa capacité à stimuler la sécrétion de sucs gastriques (Matur et al., 2011).

Le dispositif expérimental mis en place ne permet pas d'étudier ces hypothèses. Cependant, les études que nous avons réalisées chez le rat ont montré que la production journalière de fèces et d'urine étaient comparables entre les animaux exposés aux mycotoxines seules et les animaux supplémentés. De la même manière, nous n'avons observés aucun signe de la modification progressive des conditions digestives chez la brebis. Les mesures d'ingestion d'aliments, de pH urinaires, de production de fèces et d'urine étaient comparables à ceux mesurés durant la période d'adaptation aux régimes. Ces régularités pourraient refléter une activité ruminale stable. **A partir de ces observations, on peut donc penser que l'effet de la paroi de levure sur la réduction de l'absorption des mycotoxines n'est pas du à des changements physiologiques.**

En montrant dans ce travail de thèse que la paroi de levure diminue l'absorption digestive et favorise l'élimination fécale des mycotoxines, on peut raisonnablement penser que ses effets sur la biodisponibilité des mycotoxines sont liés à ses propriétés adsorbantes.

Il faut d'abord souligner que ces effets sont observés dans un ordre chronologique compatible avec les délais de transit de l'adsorbant dans le TGI des animaux. L'effet systémique maximal est atteint très rapidement moins de 6 h après administration de la dose. L'effet maximal dans les fèces apparaît dans un période allant de 24h chez le rat jusqu'à 48h chez la brebis qui élimine les substances non digérées plus lentement par la voie fécale (24 h dans le rumen+ 24h dans les intestins) (Faichney, 1995).

Chez la brebis, les résultats montrent qu'un traitement de trois semaines par la paroi de levure entraîne une élévation beaucoup plus significative de l'excrétion fécale, en comparaison à celle observée dans la période d'exposition courte de trois jours. Ces différences d'efficacité pourraient être la conséquence de l'accumulation progressive de la paroi de levure dans le TGI du ruminant. L'absorption de l'AFB1 s'effectue dès le rumen et se prolonge jusqu'au niveau de l'intestin grêle. Une fraction de l'AFB1 absorbée est métabolisée par le foie en AFM1 (Kuילman et al., 1998). L'AFM1 est sécrété par voie biliaire (Trucksess et al., 1983) et peut être réabsorbée au niveau entérique. La paroi de levure, présente en plus grande quantité dans le tractus digestif du ruminant a certainement séquestré plus d'AFB1 et rompu le cycle entéro-hépatique de l'AFM1 en liant le métabolite dans le TGI. Cependant, très peu d'études permettent d'appuyer cette hypothèse. La séquestration de l'AFM1 par les  $\beta$ -D-glucanes des parois de levure n'a pas été démontrée à notre

connaissance. On peut toutefois citer les travaux de Markov et al., (2010) et Gratz et al., (2006) sur les bactéries lactiques. Ce sont des agents adsorbants capables de réduire le taux d'AFB1 et d'AFM1 *in vitro* et d'entraîner *in vivo* l'excrétion facilitée des deux toxines dans les fèces.

Les effets sur les paramètres toxicocinétiques sont également à mettre en parallèle avec plusieurs observations faites *in vitro* sur la séquestration des mycotoxines par la paroi de levure. Dans notre étude chez le rat, la réduction de l'absorption était plus marquée vis-à-vis de l'AFB1 que de l'OTA à des taux d'inclusion similaires, ce qui peut être lié au fait que les mycotoxines n'ont pas la même affinité pour la fixation aux  $\beta$ -D-glucanes de l'extrait de paroi de levure (AFB1>OTA) (Devegowda et al., 1998a).

Les parois de levure forment des complexes moins stables avec l'AFB1 dans les conditions simulant les compartiments gastriques du ruminant (Moschini et al., 2008) que ceux des animaux monogastriques (Dawson et al., 2001, Diaz et al., 2003); ce qui pourrait expliquer que les effets sur l'excrétion des aflatoxines sont plus marqués chez le rat que chez la brebis.

L'efficacité de séquestration de la paroi de levure peut être modulée *in vitro* par la quantité de mycotoxines ajoutée au milieu. Les premières liaisons moléculaires induisent des changements de conformation facilitant l'accès à de nouveaux sites de fixation et l'amélioration de l'efficacité de séquestration des mycotoxines jusqu'à saturation (Yiannikouris *et al.*, 2003; Yiannikouris *et al.*, 2006). Aux doses de mycotoxines testées chez le rat, le seuil minimal de contact physique capable de produire ces interactions de coopération n'était peut être pas dépassé et pourrait être la raison pour laquelle nous n'avons pas observé d'effets dose-dépendant.

**La modification des paramètres d'absorption et d'excrétion observés dans nos essais serait donc à mettre au profit de la séquestration des mycotoxines et la stabilité des complexes formés avec la paroi de levure dans le TGI des animaux.**

## **II. LA MESURE DES PARAMETRES NON SPECIFIQUES**

L'essai chez la brebis laitière était conduit dans le but de vérifier que l'apport régulier en parois de levure pouvait non seulement réduire l'absorption de l'AFB1 mais aussi garantir le maintien des performances de production de l'animal exposé. Cependant, la dose d'aflatoxine

choisie n'était pas assez élevée et administrée sur une période trop courte pour altérer significativement la production et la qualité du lait de brebis. Les paramètres de production mesurés dans nos conditions expérimentales n'ont été modifiés ni par la contamination de l'alimentation par les aflatoxines ni par l'addition de l'adsorbant dans la ration.

L'évolution des paramètres zootechniques durant les 5 semaines de mesure était conforme à ce qui est généralement observé chez la brebis Lacaune en milieu de lactation progressant vers le tarissement. Les paramètres de production et de composition du lait étaient comparables à ceux reportés dans la littérature (Bocquier and Caja, 2001). La production de lait déclinait lentement durant toute la durée de l'expérience. Le maintien des TB, TP, TG et du nombre des CS était en accord avec le comportement alimentaire des brebis. Les quantités d'aliments ingérés sont restées régulières d'un jour à l'autre et l'évolution du poids vifs des animaux constante durant toute la durée de l'expérimentation.

L'absence d'effets sur les paramètres zootechniques dans notre étude est en accord avec les données de la littérature obtenus chez la brebis (Battacone et al., 2003) et d'autres ruminants en lactation comme la vache (Kutz et al., 2009) et la chèvre (Rao and Chopra, 2001) pour des quantités d'aflatoxines ingérées et des périodes d'exposition voisines.

**Notre étude expérimentale aura surtout été l'occasion de montrer l'intérêt d'évaluer l'efficacité d'un adsorbant par la mesure des paramètres spécifiques chez le ruminant exposé à des doses d'AFB1 compatibles avec les niveaux de contamination naturels de l'alimentation animale.**

### **III. EST-CE QUE LES EFFETS TOXICOCINETIQUES ONT UNE SIGNIFICATION BIOLOGIQUE?**

L'usage des adsorbants en alimentation animale n'est envisagé en Europe que pour compléter les stratégies préventives existantes et limiter les effets toxiques lié à ingestion répétée de faibles doses d'aflatoxines et d'ochratoxines. Cependant l'effet de séquestration observé sur les deux modèles expérimentaux ne permet pas d'affirmer que l'ajout d'adsorbant puisse protéger efficacement les animaux des risques sanitaires pour ce mode d'exposition. En effet, nous n'avons pas pu confirmer lors de nos travaux que les effets sur les paramètres toxicocinétiques s'accompagnent bien de l'amélioration de la santé des animaux exposés aux

mycotoxines. D'autre part, nous avons constaté que les effets sur les paramètres d'absorption et d'excrétion des mycotoxines sont partiels. Une faible fraction de la dose administrée est retenue dans le TGI des animaux et éliminée par la voie fécale.

Les études conduites chez le rat suggèrent que la protection de la préparation testée est beaucoup moins efficace en cas de contamination par l'OTA. D'autres adsorbants organiques ont été évalués avec succès par les mêmes paramètres chez le rat et le porc (Aoudia et al., 2009, Aoudia et al., 2008) et seraient peut être mieux adaptés pour traiter l'alimentation des monogastriques d'élevage. Cependant, il faut souligner que l'OTA ne peut subir une hydrolyse en OT $\alpha$  que dans les compartiments fermentaires du gros intestin chez les monogastriques. Dans le cas des ruminants où la détoxification de l'OTA survient avant son absorption digestive, on pourrait s'attendre à ce que les effets de la préparation testée sur les paramètres toxicocinétiques soient plus marqués.

Bien qu'il soit prématuré de s'avancer sans études toxicologiques, on pourrait penser qu'une réduction de la fraction orale absorbée par l'ajout de l'adsorbant soit responsable de la réduction de la toxicité de l'AFB1 déjà observée dans les évaluations antérieures (Aravind et al., 2003; karaman et al., 2005).

Pour évaluer l'efficacité de l'adsorbant à diminuer la biodisponibilité de l'OTA chez le ruminant et son applicabilité en tant qu'agent de détoxification, d'autres essais *in vivo* seraient utiles. L'étude de l'effet de l'adsorbant sur l'excrétion de l'OTA chez la brebis permettrait de confirmer ou d'infirmer les résultats observés chez le rat. Aussi, un travail de validation biologique, qui n'a pas fait l'objet de notre étude, pourrait être engagé pour établir une causalité entre la réduction de l'exposition des ruminants aux mycotoxines et des bénéfices sur leur état de santé.

#### **IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont apporté une preuve de l'efficacité d'un adsorbant de mycotoxines à base de parois de levures et de préciser son mode d'action *in vivo*. Jusqu'à présent, l'évaluation de ce produit n'avait été faite que sur la base de paramètres zootechniques et toxicologiques non spécifiques ou par l'étude du transfert d'AFM1 dans le lait chez la vache laitière. En élargissant le champ de l'étude des paramètres spécifiques, nous avons pu montrer que l'addition de parois de levures réduit l'absorption et augmente significativement l'excrétion fécale des mycotoxines testées chez deux modèles animaux,

monogastrique et ruminant. Ces observations suggèrent un effet de séquestration *in vivo* et supposent que la moindre sensibilité des animaux à la toxicité des mycotoxines, déjà observée dans d'autres études, soit très probablement la conséquence directe de la réduction de leur biodisponibilité dans l'organisme. Enfin de manière plus générale, cette étude apporte une preuve d'intérêt du concept de l'utilisation d'adsorbants organiques pour la détoxification des mycotoxines. Les résultats obtenus dans les conditions simulant l'alimentation des animaux crédibilisent l'usage prophylactique des adsorbants organiques pour maîtriser les risques sanitaires liés à la contamination des principales espèces de ruminants d'élevage.

La préparation de parois de levures que nous avons testée semble en mesure de garantir la protection des ruminants contre une exposition faible et prolongée aux aflatoxines et pourraient être proposée aux éleveurs pour substituer les traitements existants. Cependant on peut regretter de ne pas avoir pu prolonger la période d'exposition ainsi que nos observations sur les paramètres de production des brebis laitières.

Il serait intéressant d'approfondir ces aspects par des études à très long-terme. On peut supposer que mettre en évidence les effets zootechniques de la paroi de levure chez le ruminant nécessiterait un temps plus long d'exposition à l'AFB1 et de distribution de l'additif. Des évaluations sur le cycle entier de production de l'animal, voir sur toute son existence (dès la gestation) incluant d'autres paramètres toxicologiques (immunitaires, digestifs, fermentaires) permettraient de confirmer l'activité de détoxification chez le ruminant. Cependant l'absence de marqueurs de toxicité fiables et sensibles est un frein à l'évaluation de l'efficacité des adsorbants. Dans ce contexte, le développement de la métabolomique comme nouvel outil de diagnostic peut s'avérer intéressant pour mieux caractériser l'exposition aux mycotoxines. La comparaison des empreintes métaboliques urinaires chez les animaux ayant reçu les mycotoxines seules ou avec l'adsorbant permettrait de mettre en évidence des marqueurs d'exposition et d'apporter ainsi de nouvelles preuves de l'efficacité de l'agent adsorbant.

Au vu de nos résultats, il apparaît que la pertinence du traitement des matières premières par la paroi de levure testée reste discutable en ce qui concerne l'alimentation des animaux de races laitières. En effet, la détoxification des mycotoxines n'a pas pour objectif premier de préserver la santé de l'animal en lactation exposé mais vise à réduire le risque d'intoxication chronique chez l'homme par la prévention de la contamination des produits laitiers. La contamination du lait par les principales mycotoxines (OTA, DON, ZEN, FB)

étant considérée comme faible ou nulle (Niderkorn V., 2007), seule la présence d'AFM1 est véritablement perçue comme un danger sanitaire pour les consommateurs.

L'expérience conduite chez la brebis laitière n'a pas permis de conclure affirmativement aux bénéfices de la préparation testée sur la réduction de la contamination du lait et laisse subsister l'incertitude autour de son utilisation dans l'industrie laitière. Il serait donc intéressant de poursuivre le travail en réalisant un suivi du taux d'AFM1 excrété dans le lait de brebis en modifiant les conditions expérimentales. Durant l'expérience, les volumes de lait produits étaient inférieurs à ceux mesurés à la réception des animaux dans nos installations (1.5 L de lait/jour vs 3 L/jour avant l'étude). Afin de valider les données obtenues, la mise en place d'une expérimentation sur des animaux ayant atteint le pic de lactation et recevant des doses inférieures aux normes réglementaires européennes permettrait d'évaluer plus précisément l'efficacité de la préparation testée par les paramètres d'excrétion de l'AFM1 dans le lait.

L'efficacité de l'adsorbant a aussi pu être limitée par le fait que l'alimentation expérimentale ne contenait pas que de l'AFB1 et présentait aussi des teneurs importantes d'AFB2, de l'AFG1 et de l'AFG2 en plus faible quantité représentant 38, 5, et 9 % de la dose journalière administrée en aflatoxines. En effet, la recherche et le développement d'adsorbants pour la détoxification de ces aflatoxines présente peu d'intérêt du fait qu'elles sont moins fréquentes et moins toxiques par rapport à l'AFB1 ou l'AFM1. Cependant, la présence d'aflatoxines B2, G2 et G1 dans l'alimentation expérimentale puis dans l'organisme pourrait influencer la séquestration de l'AFB1 et l'excrétion de l'AFM1 dans le lait. Pour étayer cette hypothèse, d'autres évaluations précisant l'effet de la préparation testée sur la séquestration et la biodisponibilité de ces aflatoxines seraient nécessaires.

Notre travail de thèse est le premier à avoir évalué l'efficacité d'un adsorbant chez le ruminant par le suivi de l'excrétion d'une mycotoxine dans l'urine, les fèces et le lait. Aussi, nous avons pu constater que les effets de la paroi de levure étaient plus marqués dans les fèces que dans les deux autres matrices biologiques. Dans une optique de criblage *in vivo*, une évaluation de nouveaux adsorbants candidats se focalisant uniquement sur la mesure des paramètres d'excrétion dans les fèces serait suffisante pour apporter une preuve d'efficacité chez le ruminant.

Le ruminant présente un risque d'exposition accru à des contaminations multiples par la diversification de son régime alimentaire. C'est donc aussi à travers une maîtrise de la contamination par les fumonisines, les trichothécènes, la zéaralénone que l'emploi

d'adsorbants organiques revêt un intérêt grandissant en alimentation animale. Des niveaux de concentrations inacceptables sont parfois détectés dans les productions céréalières distribuées au bétail en Europe. A la différence des aflatoxines, peu de traitements adsorbants sont efficaces vis-à-vis des fusariotoxines et la prévention du développement des moisissures demeure jusqu'à ce jour le seul moyen disponible pour prévenir les risques sanitaires posés par cette famille de mycotoxines (Niderkorn et al., 2006).

Les résultats de notre étude expérimentale amènent à s'interroger sur l'utilisation d'adsorbants organiques pour réduire la biodisponibilité des fusariotoxines chez les animaux exposés à ces contaminants alimentaires. Dans cette perspective, des études cinétiques complémentaires pourraient renseigner de l'efficacité de la préparation que nous avons testée vis à vis de la ZEN, du DON, ou de la FB1 afin d'établir un profil détaillé de son activité de détoxification chez le ruminant.

La connaissance sur l'efficacité des adsorbants organiques a beaucoup progressé au cours de ces dernières années cependant aucun des produits testés ne possède les caractéristiques de l'agent de détoxification idéal pour traiter l'ensemble des mycotoxines d'intérêt alimentaire (Whitlow, 2006). Dès lors, les recherches se focalisant sur la mesure des paramètres toxicocinétiques et la balance d'excrétion des mycotoxines devraient apporter l'information utile pour envisager dans le futur des associations d'adsorbants organiques. Optimisées, ces combinaisons d'adsorbants permettraient de gérer au quotidien la contamination des aliments du bétail par les mycotoxines et de satisfaire *in fine* aux attentes productivistes des éleveurs et sécuritaires des consommateurs de produits de la filière animale.

Les recherches menées sur les adsorbants organiques pourraient aboutir à des applications en nutrition humaine. En effet, certains adsorbants à base d'argile développés pour la nutrition animale font l'objet d'essais cliniques dans les pays émergents confrontés aux contaminations par les aflatoxines (Phillips et al., 2008). Comme pour ces produits minéraux, l'administration d'adsorbants organiques pourrait être envisagée pour traiter les populations des zones à risques. Cette application pourrait également être étendue en Europe chez certaines populations particulièrement exposées comme les agriculteurs amenés au contact des mycotoxines de part leur situation professionnelle (Turner et al., 2010). Ainsi, les adsorbants organiques pourraient être utilisés pour prévenir les risques sanitaires liés à

l'ingestion de poussières contaminées inhalées par les travailleurs agricoles sur les lieux de travail (silos de stockage de céréales).

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**A**

- Abousadi, M. A., E. Rowghani, and M. E. Honarmand. 2007. The efficacy of various additives to reduce the toxicity of aflatoxin B-1 in broiler chicks. *Iran J. Veterinary Res.* **8(2)**:144-150.
- Abrunhosa, L., L. Santos, and A. Venancio. 2006. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.* **20(3)**:231-242.
- Abrunhosa, L. and A. Venancio. 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **29(12)**:1909-1914.
- AFSSA. 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale.  
[http://www.inbpinnov.com/media/mycotoxines\\_afssa\\_075603600\\_1217\\_21092010.pdf](http://www.inbpinnov.com/media/mycotoxines_afssa_075603600_1217_21092010.pdf).
- Aly, S. A. and H. Diekmann. 2010. Fate of aflatoxin M-1 during manufacture and storage of yoghurt. *Milchwiss.-Milk Sci. Int.* **65(2)**:193-194.
- Amezqueta, S., E. Gonzalez-Penas, M. Murillo-Arbizu, and A. L. de Cerain. 2009. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* **20(4)**:326-333.
- Aoudia, N., P. Callu, F. Grosjean, and Y. Larondelle. 2009. Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. *Food Chem. Toxicol.* **47(7)**:1485-1489.
- Aoudia, N., E. K. Tangni, and Y. Larondelle. 2008. Distribution of ochratoxin A in plasma and tissues of rats fed a naturally contaminated diet amended with micronized wheat fibres: Effectiveness of mycotoxin sequestering activity. *Food Chem. Toxicol.* **46(3)**:871-878.
- Auerbach H., Maas R.F.M., Op den Camp H.J.M., Pol A., and Finks-Gremmels J. 1998. Biodegradation of aflatoxin B1 by bovine rumen microorganisms in vitro and its effects on rumen fermentation *Rev. Med. Vet.* **149**:573.
- Awad, W. A., K. Ghareeb, J. Bohm, and J. Zentek. 2010. Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **27(4)**:510-520.

**B**

- Bandazhevskaya, G. S., V. B. Nesterenko, V. I. Babenko, I. V. Babenko, T. V. Yerkovich, and Y. I. Bandazhevsky. 2004. Relationship between Caesium ((CS)-C-137) load, cardiovascular symptoms, and source of food in "Chernobyl" children - preliminary observations after intake of oral apple pectin. *Swiss Med. Wkly.* **134(49-50)**:725-729.
- Banlunara, W., A. Bintvihok, and S. Kumagai. 2005. Immunohistochemical study of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in duckling liver fed with aflatoxin B1 and esterified glucomannan. *Toxicon* **46(8)**:954-957.

- Baptista, A. S., J. Horii, M. A. Calori-Domingues, E. M. da Gloria, J. M. Salgado, and M. R. Vizioli. 2004. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20(5)**:475-481.
- Baptista, A. S., J. Horii, M. A. Calori-Domingues, E. M. d. Glória, J. M. Salgado, and M. R. Vizioli. 2002. Thermolysed and active yeast to reduce the toxicity of aflatoxin. *Sci Agric* **59**:257-260.
- Barbiroli, A., F. Bonomi, S. Benedetti, S. Mannino, L. Monti, T. Cattaneo, and S. Iametti. 2007. Binding of aflatoxin M-1 to different protein fractions in ovine and caprine milk. *J. Dairy Sci.* **90(2)**:532-540.
- Bata, A. and R. Lasztity. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.* **10(6-7)**:223-228.
- Battaccone, G., G. A. Carboni, P. Nicolussi, C. Patta, and G. Pulina. 2007. Effects of a commercial sequestering agent on performances of fattening pigs fed diet artificially contaminated by aflatoxin B1 and ochratoxin A. *J. Dairy Sci.* **90**:620-621.
- Battaccone, G., A. Nudda, A. Cannas, A. C. Borlino, G. Bomboi, and G. Pulina. 2003. Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *J. Dairy Sci* **86(8)**:2667-2675.
- Battaccone, G., A. Nudda, M. Palomba, A. Mazzette, and G. Pulina. 2009. The transfer of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. *J. Dairy Sci.* **92(10)**:4997-5004.
- Battaccone, G., A. Nudda, M. Palomba, M. Pascale, P. Nicolussi, and G. Pulina. 2005. Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *J. Dairy Sci.* **88(9)**:3063-3069.
- Baurhoo, B., P. R. Ferket, and X. Zhao. 2009. Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poult. Sci.* **88(11)**:2262-2272.
- Bayman, P. and J. L. Baker. 2006. Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia* **162(3)**:215-223.
- Bejaoui, H., F. Mathieu, P. Taillandier, and A. Lebrihi. 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* **97(5)**:1038-1044.
- Binder, E. M., L. M. Tan, L. J. Chin, J. Handl, and J. Richard. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137(3-4)**:265-282.
- Blank, R., J. P. Rolfs, K. H. Sudekum, A. A. Frohlich, R. R. Marquardt, and S. Wolfram. 2003. Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *J. Agric. Food Chem.* **51(23)**:6899-6905.

- Blank, R. and S. Wolfram. 2009. Effects of live yeast cell supplementation to high concentrate diets on the toxicokinetics of ochratoxin A in sheep. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **26(1)**:119-126.
- Bocquier, F. and G. Caja. 2001. Effects of nutrition on ewes' milk quality. *Prod. Anim.* **14(2)**:129-140.
- Bognanno, M., L. La Fauci, A. Ritieni, A. Tafuri, A. De Lorenzo, P. Micari, L. Di Renzo, S. Ciappellano, V. Sarullo, and F. Galvano. 2006. Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS. *Mol Nutr Food Res* **50(3)**:300-305.
- Boudra, H. 2009. Mycotoxins : an insidiously menacing factor for the quality of forages and the performances of the ruminants. *Fourrages* (**199**):265-280.
- Boudra, H., D. Alvarez, J. P. Jouany, and M. D. P. 2005. Transmission of ochratoxin a into ewe's milk following a single or a chronic ingestion of contaminated feed. in *The world mycotoxin forum, 3<sup>rd</sup> Conf., Noordwijk, the Netherlands*, **45**.
- Boudra, H., J. Barnouin, S. Dragacci, and D. P. Morgavi. 2007. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *J. Dairy Sci.* **90(7)**:3197-3201.
- Boudra, H., P. Lebars, and J. Lebars. 1995. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under 2 moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(3)**:1156-1158.
- Boudra, H. and D. P. Morgavi. 2006. Development and validation of a HPLC method for the quantitation of ochratoxins in plasma and raw milk. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* **843**:295-230.
- Breitholtzemanuelsson, A., M. Olsen, A. Oskarsson, I. Palminger, and K. Hult. 1993. Ochratoxin-A in cows milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC Int.* **76(4)**:842-846.
- Brossard, L., C. Martin, F. Chaucheyras-Durand, and B. Michalet-Doreau. 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* **44(3)**:195-206.
- Bruemmer, M., C. J. van Rensburg, and C. A. Moran. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall products: The effects on gut morphology and performance of broiler chickens. *South Afr. J. Anim. Sci.* **40(1)**:14-21.
- Bursian, S. J., R. R. Mitchell, B. Yamini, S. D. Fitzgerald, P. A. Murphy, G. Fernandez, G. E. Rottinghaus, L. Moran, K. Leefers, and I. Choi. 2004. Efficacy of a commercial mycotoxin binder in alleviating effects of ochratoxin A, fumonisin B1, moniliformin and zearalenone in adult mink. *Vet Hum Toxicol* **46(3)**:122-129.

## C

- Cano-Sancho, G., S. Marin, A. J. Ramos, J. Peris-Vicente, and V. Sanchis. 2010. Occurrence of aflatoxin M-1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Rev. Iberoam. Micol.* **27(3)**:130-135

- Carson, M. S. and T. K. Smith. 1983. Effect of Feeding Alfalfa and Refined Plant Fibers on the Toxicity and Metabolism of T-2 Toxin in Rats. *J. Nutr.* **113(2)**:304-313.
- Celyk, K., M. Denly, and T. Savas. 2003. Reduction of toxic effects of aflatoxin B-1 by using baker yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in growing broiler chicks diets. *Rev. Bras. Zootecn.* **32(3)**:615-619.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* **145(1-4)**:5-26.
- Chung, Y. H., N. D. Walker, S. M. McGinn, and K. A. Beauchemin. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94(5)**:2431-2439.
- Chiavaro, E., C. Cacchioli, E. Berni, and E. Spotti. 2005. Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxins B-1 and M-1 in pig liver: Comparison with high-performance liquid chromatography determination. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **22(11)**:1154-1161.
- Chulze, S. N. 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: a review. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **27(5)**:651-657.
- Cigic, I. K. and H. Prosen. 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *Int. J. Mol. Sci.* **10(1)**:62-115.
- Cinar, M., E. Yildirim, I. Yalcinkaya, and G. Eraslan. 2008. The Effects of Yeast Glucosaminan (Mycosorb) on Lipid Peroxidation and Non-Enzymatic Antioxidative Status in Experimentally Induced Aflatoxicosis in Broilers. *J. Anim. Vet. Adv.* **7(5)**:539-544.
- Cole, R. J. and R. H. Cox. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press ed., New York.
- Cole, R. J., B. B. Jarvis, and M. A. Schweikert. 2003. Second handbook of secondary fungal metabolites. New York.
- Coulombe, R. A., Jr. and R. P. Sharma. 1985. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **23(9)**:827-830.
- Creppy, E. E., F. C. Stormer, R. Rosenthaler, and G. Dirheimer. 1983. Effects of 2 metabolites of Ochratoxin- A, (4R)-4-hydroxyochratoxin-A and Ochratoxin alpha, on immune response in mice. *Infect. Immun.* **39(3)**:1015-1018.

## D

- Dahlmann, A., W. H. Dantzler, S. Silbernagl, and M. Gekle. 1998. Detailed mapping of ochratoxin a reabsorption along the rat nephron in vivo: The nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286(1)**:157-162.

- Dall'Asta, C., G. Galaverna, T. Bertuzzi, A. Moseriti, A. Pietri, A. Dossena, and R. Marchelli. 2010. Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem.* **120(4)**:978-983.
- Dall'Asta, C., J. D. Lindner, G. Galaverna, A. Dossena, E. Neviani, and R. Marchelli. 2008. The occurrence of ochratoxin A in blue cheese. *Food Chem.* **106(2)**:729-734.
- Dawson, K. A., J. Evans, and M. Kudupoje. 2001. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations. Pages 169-181 in *Biotechnology in Feed Industry* Nottingham,UK:Nottingham University Press ed. Lyons TP et Jacques KA.
- Devegowda, G. 2000. Mettre les mycotoxines sur la touche: d'ou viennent les glucomannanes estérifiés? Pages 12-14 in *Feeding Times*. Vol. 4.
- Devegowda, G., B. I. R. Aravind, M. G. Morton, and K. Rajendra. 1996. Saccharomyces cerevisiae and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. Pages 103-108 in *Proceedings of Australian Poultry Science Symposium*, Sydney, Australia.
- Devegowda, G., M. V. L. N. Raju, N. Afzali, and H. V. L. N. Swamy. 1998a. Mycotoxin picture world-wide: novel solutions for their counteraction Pages 241-256 in *Biotechnology in the Feed Industry* Nottingham,UK:Nottingham University Press ed. Lyons TP et Jacques KA.
- Devegowda, G., M. V. L. N. Raju, and H. V. L. N. Swamy. 1998b. Mycotoxins: novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs* **7**:12-15.
- Dicks, L. M. T. and M. Botes. 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes* **1(1)**:11-29.
- Diaz, D. E. and K. T. Smith. 2005. Mycotoxin sequestering agents: practical tools for the neutralisation of mycotoxins Pages 323-339 in *The mycotoxin blue book* Nottingham,UK:Nottingham University Press ed. D. Diaz, ed. Nottingham university press, Nottingham, UK.
- Diaz-Llano, G. and T. K. Smith. 2006. Effects of feeding grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins with and without a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts. *J. Anim. Sci.* **84(9)**:2361-2366.
- Diaz-Llano, G. and T. K. Smith. 2007. The effects of feeding grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins with and without a polymeric glucomannan adsorbent on lactation, serum chemistry, and reproductive performance after weaning of first-parity lactating sows. *J. Anim. Sci.* **85(6)**:1412-1423.
- Diaz, D., W. Hagler, B. Hopkins, and L. Whitlow. 2003. Aflatoxin Binders I: In vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia* **156(3)**:223-226.
- Diaz, G. J., A. Cortes, and L. Roldan. 2005. Evaluation of the efficacy of four feed additives against the adverse effects of T-2 toxin in growing broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* **14(2)**:226-231.
- Dvorska, J. E., A. C. Pappas, F. Karadas, B. K. Speake, and P. F. Surai. 2007. Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken

liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol.* **145(4)**:582-587.

Dvorska, J. E., P. E. Surai, B. K. Speake, and N. H. C. Sparks. 2003. Protective effect of modified glucomannans against aurofusarin-induced changes in quail egg and embryo. *Comp Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.* **135(3)**:337-343.

Dvorska, J. E. and P. F. Surai. 2001. Effects of T-2 toxin, zeolite and Mycosorb on antioxidant systems of growing quail. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **14(12)**:1752-1757.

## E

EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to aflatoxin B1 (AFB1) as undesirable substance in animal feed. [http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/opinion\\_contam\\_02\\_en\\_final1,1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/opinion_contam_02_en_final1,1.pdf)

EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) as undesirable substance in animal feed. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/s101.pdf>

EFSA. 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/22e.pdf>.

Egner, P. A., X. Yu, J. K. Johnson, C. K. Nathasingh, J. D. Groopman, T. W. Kensler, and B. D. Roebuck. 2003. Identification of Aflatoxin M1-N7-Guanine in Liver and Urine of Tree Shrews and Rats Following Administration of Aflatoxin B1. *Chem. Res. Toxicol.* **16(9)**:1174-1180.

El-Nezami, H., P. Kankaanpaa, S. Salminen, and J. Ahokas. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B-1. *Food Chem. Toxicol.* **36(4)**:321-326.

El-Nezami, H. S., A. Chrevatidis, S. Auriola, S. Salminen, and H. Mykkanen. 2002. Removal of common Fusarium toxins in vitro by strains of Lactobacillus and Propionibacterium. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **19(7)**:680-686.

El-Nezami, H. S., N. N. Polychronaki, J. Ma, H. L. Zhu, W. H. Ling, E. K. Salminen, R. O. Juvonen, S. J. Salminen, T. Poussa, and H. M. Mykkanen. 2006. Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am. J. Clin. Nutr.* **83(5)**:1199-1203.

## F

Faichney, G. J. 1995. Transit des digesta dans le tube digestif des ruminants. in Nutrition des ruminants domestiques- ingestion et digestion. INRA ed. R. Jarrige, Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, H.M., Journet, M., ed, Paris, France.

- Fink-Gremmels, J. 2008a. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **25(2)**:172-180.
- Fink-Gremmels, J. 2008b. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet. J.* **176(1)**:84-92.
- Fonty, G., J. P. Jouany, J. Senaud, P. Gouet, and J. Grain. 1984. The evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months. *Can. J. Anim. Sci.* **64**:165-166.
- Frobish, R. A., B. D. Bradley, D. D. Wagner, P. E. Longbradley, and H. Hairston. 1986. Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain. *J. Food Prot.* **49(10)**:781-785.
- Fuchs, S., G. Sontag, R. Stidl, V. Ehrlich, M. Kundi, and S. Knasmuller. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **46(4)**:1398-1407.

## G

- Galtier, P. 1999. Biotransformation and fate of mycotoxins. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* **18(3-4)**:295-312.
- Galtier, P. and Alvinerie M. 1976. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann. Rech. Vet.* **7(1)**:91-98.
- Galtier, P., I. P. Oswald, P. Guerre, D. Morgavi, H. Boudra, and J. P. Jouany. 2008. The mycotoxic risk: danger and health impact in animal production. *Prod. Anim.* **21(1)**:107-116.
- Galvano, F., V. Galofaro, A. De Angelis, M. Galvano, M. Bognanno, and G. Galvano. 1998. Survey of the occurrence of aflatoxin M-1 in dairy products marketed in Italy. *J. Food Prot.* **61(6)**:738-741.
- Gareis, M. and R. Scheuer. 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. *Arch. Lebensm. Hyg.* **51(4-5)**:102-104.
- Ghahri, H., A. Talebi, M. Chamani, H. Lotfollahian, and N. Afzali. 2009. Ameliorative effect of esterified glucomannan, sodium bentonite, and humic acid on humoral immunity of broilers during chronic aflatoxicosis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **33(5)**:419-425.
- Giorni, P., N. Magan, A. Pietri, T. Bertuzzi, and P. Battilani. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **113(3)**:330-338.
- Girgis, G. N., S. Sharif, J. R. Barta, H. J. Boermans, and T. K. Smith. 2008. Immunomodulatory Effects of Feed-Borne *Fusarium* Mycotoxins in Chickens Infected with *Coccidia*. *Exp. Biol. Med.* **233(11)**:1411-1420.
- Girish, C. K. and C. Devegowda. 2006. Efficacy of glucomannan-containing yeast product (Mycosorb (R)) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and

- combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian Australas. J. Anim. Sci.***19(6)**:877-883.
- Girish, C. K. and T. K. Smith. 2008. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on small intestinal morphology of turkeys. *Poult. Sci.***87(6)**:1075-1082.
- Girish, C. K., T. K. Smith, H. J. Boermans, and N. A. Karrow. 2008. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance, hematology, metabolism, and immunocompetence of turkeys. *Poult. Sci.***87(3)**:421-432.
- Gomez-Arranz, E. and I. Navarro-Blasco. Aflatoxin M-1 in Spanish infant formulae: occurrence and dietary intake regarding type, protein-base and physical state. *Food Addit. Contam. Part B-Surveill.* **3(3)**:193-199.
- Govaris, A., V. Roussi, P. A. Koidis, and N. A. Botsoglou. 2002. Distribution and stability of aflatoxin M-1 during production and storage of yoghurt. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **19(11)**:1043-1050.
- Gratz, S., M. Taubel, R. O. Juvonen, M. Viluksela, P. C. Turner, H. Mykkanen, and H. El-Nezami. 2006. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates toxicity and kinetics of orally administered AFB(1) in rats. *Toxicol. Lett.***164**:S153-S153.
- Groopman, J. D., P. R. Donahue, J. Zhu, J. Chen, and G. N. Wogan. 1985. Aflatoxin Metabolism in Humans: Detection of Metabolites and Nucleic Acid Adducts in Urine by Affinity Chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82(19)**:6492-6496.
- Groopman, J. D., T. W. Kensler, and C. P. Wild. 2008. Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries. *Annu Rev Public Health* **29(1)**.
- Guarisco, J. A., J. O. Hall, and R. A. Coulombe. 2008. Butylated hydroxytoluene chemoprevention of aflatoxicosis - Effects on aflatoxin B-1 bioavailability, hepatic DNA adduct formation, and biliary excretion. *Food Chem. Toxicol.***46(12)**:3727-3731.
- Guengerich, F. P., W. W. Johnson, Y. F. Ueng, H. Yamazaki, and T. Shimada. 1996. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B-1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ. Health Perspect.* **104**:557-562.
- Guerre, P., P. Galtier, and V. Burgat. 1996a. Animal aflatoxicosis: From clinical observations to mechanisms of action. *Rev. Med. Vet.***147(7)**:497-518.
- Guerre, P., P. Galtier, and V. Burgat. 1996b. Metabolism and susceptibility to aflatoxins toxicity. *Rev. Med. Vet.* **147(12)**:879-892.
- Gutzwiller, A., L. Czeglédi, P. Stoll, and L. Bruckner. 2007. Effects of *Fusarium* toxins on growth, humoral immune response and internal organs in weaner pigs, and the efficacy of apple pomace as an antidote. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **91(9-10)**:432-438.

## H

- Halasz, A., R. Lasztity, T. Abonyi, and A. Bata. 2009. Decontamination of Mycotoxin-Containing Food and Feed by Biodegradation. *Food Rev. Int.***25(4)**:284-298.
- Hasan, G., T. Toloei, and M. Habibi. 2010. Efficacy of esterified glucomannan, sodium bentonite and humic acid to counteract experimental aflatoxicosis on antibody titers against Newcastle disease in broilers. *Afr. J. Biotechnol.***9(26)**:4127-4131.
- Haskard, C., C. Binnion, and J. Ahokas. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chem.-Biol. Interact.***128(1)**:39-49.
- Hayes, A. W., R. E. King, P. D. Unger, T. D. Phillips, J. Hatkin, and J. H. Bowen. 1978. Aflatoxicosis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.***172(11)**:1295-1297.
- He, J. W., T. Zhou, J. C. Young, G. J. Boland, and P. A. Scott. 2010. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **21(2)**:67-76.
- Helferich, W. G., R. L. Baldwin, and D. P. H. Hsieh. 1986. [C-14] Aflatoxin-B1 metabolism in lactating goats and rats. *J. Anim. Sci.***62(3)**:697-705.
- Herzallah, S. M. 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem.***114(3)**:1141-1146.
- Hohler, D., K. H. Sudekum, S. Wolffram, A. A. Frohlich, and R. R. Marquardt. 1999. Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep. *J. Anim. Sci.***77(5)**:1217-1223.
- Hsieh, D. P. H., A. S. Salhab, J. J. Wong, and S. L. Yang. 1974. Toxicity of aflatoxin Q1 as evaluated with the chicken embryo and bacterial auxotrophs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***30(2)**:237-242.
- Huwig, A., S. Freimund, O. Kappeli, and H. Dutler. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.***122(2)**:179-188.

## J

- Jaehrig, S. C., S. Rohn, L. W. Kroh, F. X. Wildenauer, F. Lisdat, L. G. Fleischer, and T. Kurz. 2008. Antioxidative activity of (1 → 3), (1 → 6)-beta-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT-Food Sci. Technol.***41(5)**:868-877.
- Jansen van Rensburg, C., C. E. Van Rensburg, J. B. Van Ryssen, N. H. Casey, and G. E. Rottinghaus. 2006. In vitro and in vivo assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poult. Sci.***85(9)**:1576-1583.
- Jimenez, A. M., A. L. de Cerain, E. Gonzalez-Penas, and J. Bello. 2001. Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pates by high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.***18(6)**:559-563

Jorgensen, K. and A. Petersen. 2002. Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.***19(6)**:562-567.

Jouany, J. P. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.***137(3-4)**:342-362.

## K

Kabak, B., A. D. Dobson, and I. Var. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **46(8)**:593-619.

Kamalzadeh, A., A. Hosseini, and S. Moradi. 2009. Effects of Yeast Glucomannan on Performance of Broiler Chickens. *Int J Agric Biol* **11(1)**:49-53.

Karaman, M., H. Basmacioglu, M. Ortatatli, and H. Oguz. 2005. Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. *Br. Poult. Sci.***46(3)**:394 - 400.

Kerkadi, A., C. Barriault, B. Tuchweber, A. A. Frohlich, R. R. Marquardt, G. Bouchard, and I. M. Yousef. 1998. Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **53(3)**:231-250.

Kiessling, K. H., H. Pettersson, K. Sandholm, and M. Olsen. 1984. Metabolism of Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone, and 3 Trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.***47(5)**:1070-1073.

Klis, F. M., A. Boorsma, and P. W. J. De Groot. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23(3)**:185-202.

Kogan. 2000. Bioactive natural products (part D):  $\beta$ -(1,3)-glucans and  $\beta$ -(1,6)-glucans of yeasts and fungi and their biological activity. Pages 107-151 in *Studies in Natural products Chemistry*. Attar-ur-Rahman, ed. Elsevier science B.V.

Korosteleva, S. N., T. K. Smith, and H. J. Boermans. 2007. Effects of feedborne fusarium mycotoxins on the performance, metabolism, and immunity of dairy cows. *J. Dairy Sci.***90(8)**:3867-3873.

Kuhn, I., H. Valenta, and K. Rohr. 1995. Determination of ochratoxin-A in bile of swine by high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.***668(2)**:333-337.

Kuilman, M. E. M., R. F. M. Maas, D. J. Judah, and J. Fink-Gremmels. 1998. Bovine hepatic metabolism of aflatoxin B-1. *J. Agric. Food Chem.***46(7)**:2707-2713.

Kurmanov, L. A. 1977. *Fusariotoxicosis in cattle and sheep*. Marcel Dekker Inc., New York, U.S.A.

Kussak, A., B. Andersson, and K. Andersson. 1995. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and Q1 in urine. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **672(2)**:253-259.

Kutz, R. E., J. D. Sampson, L. B. Pompeu, D. R. Ledoux, J. N. Spain, M. Vazquez-Anon, and G. E. Rottinghaus. 2009. Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M-1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B-1. *J. Dairy Sci.* **92(8)**:3959-3963.

## L

Lafont, P., J. Sarfati, J. Jacquet, M. Gaillardin, and J. Lafont. 1983. Effect of pathological and nutritional factors on the mammary excretion of aflatoxin in cows. *Microbiologie - Aliments - Nutrition* **1(3)**:293-300.

Lee, L. S., J. J. Dunn, A. J. Delucca, and A. Ciegler. 1981. Role of lactone ring of aflatoxin-B1 in toxicity and mutagenicity. *Experientia* **37(1)**:16-17.

Lillehoj, E. B., W. F. Kwolek, F. Elling, and P. Krogh. 1979. Tissue distribution of radioactivity from ochratoxin A-C14 in rats. *Mycopathologia* **68(3)**:175-177.

Lipke, P. N. and R. Ovalle. 1998. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J. Bacteriol.* **180(15)**:3735-3740.

## M

Magan, N. and D. Aldred. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* **119(1-2)**:131-139.

Magan, N., D. Aldred, K. Mylona, and R. J. W. Lambert. 2010. Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **27(5)**:644-650.

Manetta, A. C., L. Di Giuseppe, M. Giammarco, I. Fusaro, A. Simonella, A. Gramenzi, and A. Formigoni. 2005. High-performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. *J Chromatogr A* **1083(1-2)**:219-222.

Markov, K., J. Frece, D. Cvek, N. Lovric, and F. Delas. 2010. Aflatoxin M-1 in raw milk and binding of aflatoxin by lactic acid bacteria. *Mljekarstvo* **60(4)**:244-251.

Marquardt, R. R. and A. A. Frohlich. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* **70(12)**:3968-3988.

Martin, L. M., K. M. Wood, P. L. McEwen, T. K. Smith, I. B. Mandell, A. Yannikouris, and K. C. Swanson. 2010. Effects of feeding corn naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins and/or a modified yeast cell wall extract on the performance, immunity and carcass characteristics of grain-fed veal calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* **159(1-2)**:27-34.

Martins, M. L. and H. M. Martins. 2004. Aflatoxin M-1 in yoghurts in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* **91(3)**:315-317.

- Masoero, F., A. Gallo, D. Diaz, G. Piva, and M. Moschini. 2009. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **150(1-2)**:34-45.
- Masoero, F., A. Gallo, M. Moschini, G. Piva, and D. Diaz. 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows low or high somatic cell counts. *Animal* **1(9)**:1344-1350.
- Matrella, R., L. Monaci, M. A. Milillo, F. Palmisano, and M. G. Tantillo. 2006. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* **17(2)**:114-117.
- McLean, M. and M. F. Dutton. 1995. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. *Pharmacol. Ther.* **65(2)**:163-192.
- Meissonnier, G., Raymond, I., Laffitte, J., Cossalter, A., Pinton, P., Benoit, E., Bertin, G., Galtier, P., Oswald, I. 2009. Dietary glucomannan improves the vaccinal response in pigs exposed to aflatoxin B1 or T-2 toxin. *World Mycotoxin Journal* **2(2)**:161-172.
- Meucci, V., E. Razzuoli, G. Soldani, and F. Massart. 2010. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **27(1)**:64-71.
- Mezes, M., K. Balogh, and K. Toth. 2010. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins-a review. *Acta Vet. Hung.* **58(1)**:1-17.
- Molnar, O., G. Schatzmayr, E. Fuchs, and H. Prillinger. 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Syst. Appl. Microbiol.* **27(6)**:661-671.
- Monaci, L., F. Palmisano, R. Matrella, and G. Tantillo. 2005. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **1090(1-2)**:184-187.
- Montagna, M. T., C. Napoli, O. De Giglio, R. Iatta, and G. Barbuti. 2008. Occurrence of Aflatoxin M-1 in Dairy Products in Southern Italy. *Int. J. Mol. Sci.* **9(12)**:2614-2621.
- Morgavi D.P., B. H., Jouany J.-P. 2008. Consequences of mycotoxins in ruminant production. Pages 29-46 in *Mycotoxins in Farm Animals*. I. P. o. a. I. taranu, ed. Transworld Research Network.
- Moschini, M., A. Gallo, G. Piva, and F. Masoero. 2008. The effects of rumen fluid on the in vitro aflatoxin binding capacity of different sequestering agents and in vivo release of the sequestered toxin. *Anim. Feed Sci. Technol.* **147(4)**:292-309.
- Moschini, M., F. Mosoero, D. E. Diaz, A. Gallo, A. Pietri, and G. Piva. 2006. Plasma aflatoxin concentrations over time in bolus fed lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* **84**:74-74.
- Muller, H. M., K. Muller, and H. Steingass. 2001. Effect of feeding regime on the metabolism of ochratoxin A during the in vitro incubation in buffered rumen fluid from cows. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* **54(4)**:265-279.

Munoz, R., M. E. Arena, J. Silva, and S. N. Gonzalez. 2011. Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. Microbiol.***41(4)**:1019-1026.

Mykkanen, H., H. L. Zhu, E. Salminen, R. O. Juvonen, W. H. Ling, J. Ma, N. Polychronaki, H. Kemilainen, O. Mykkanen, S. Salminen, and H. El-Nezami. 2005. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B-1 metabolites (AFQ(1), AFM(1) and AFB-N-7-guanine) in young Chinese males. *Int. J. Cancer* **115(6)**:879-884.

## N

Nabney, J., M. B. Burbage, R. Allcroft, and G. Lewis. 1967. Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion pattern in the lactating ewe. *Food Cosmet Toxicol* **5(1)**:11-17.

Newman, K. 2000. The biochemistry behind esterified glucomannans-titrating mycotoxins out of the diet. Pages 369-382 in *Biotechnology in the Feed Industry*. Nottingham, UK: Nottingham University Press ed. L. T. e. J. KA, ed.

Niderkorn, V., H. Boudra, and D. P. Morgavi. 2006. Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro. *J. Appl. Microbiol.***101(4)**:849-856.

Niderkorn, V., D. P. Morgavi, B. Aboab, M. Lemaire, and H. Boudra. 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B-1 and B-2 by lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.***106(3)**:977-985.

Niderkorn, V., D. P. Morgavi, E. Pujos, A. Tissandier, and H. Boudra. 2007. Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.***24(4)**:406-415.

Niderkorn V., B. H., Morgavi D.P.. 2007. Les fusariotoxines : comment limiter leur présence dans les ensilages et leur impact chez les ruminants ? . *Fourrages* **189**:111-183.

Nip, W. K. and F. S. Chu. 1979. Fate of ochratoxin-A in goats. *J Environ Sci Health B* **14(3)**:319 - 333.

## O

Oliveira, C. A. F. and J. C. O. Ferraz. 2007. Occurrence of aflatoxin M-1 in pasteurised, UHT milk and milk powder from goat origin. *Food Control* **18(4)**:375-378.

## P

Peltonen, K., H. El-Nezami, C. Haskard, J. Ahokas, and S. Salminen. 2001. Aflatoxin B-1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Dairy Sci.***84(10)**:2152-2156.

Peltonen, K. D., H. S. El-Nezami, S. J. Salminen, and J. T. Ahokas. 2000. Binding of aflatoxin B-1 by probiotic bacteria. *J. Sci. Food Agric.***80(13)**:1942-1945.

- Peteri, Z., J. Teren, C. Vagvolgyi, and J. Varga. 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.***24(3)**:205-210.
- Pfohl-Leszkowicz, A. and R. A. Manderville. 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.***51(1)**:61-99.
- Pierides, M., H. El-Nezami, K. Peltonen, S. Salminen, and J. Ahokas. 2000. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M-1 in a food model. *J. Food Prot.***63(5)**:645-650.
- Pietri, A., T. Bertuzzi, L. Pallaroni, and G. Piva. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in Northern Italy. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.***21(5)**:479-487.
- Pitout, M. J. 1969. Hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **18**:485-491.
- Plank, B., M. Schuh, and E. M. Binder. 2009. Investigations on the effect of two feed additives, Biomin (R) BBSH 797 and Mycofix Plus (R) 3.E, as detoxificants of DON contaminated feed of piglets. *Wien. Tierarz. Monats.***96(3-4)**:55-71.
- Plank, G., J. Bauer, A. Grunkemeier, S. Fischer, B. Gedek, and H. Berner. 1990. The protective effect of adsorbents against ochratoxin A in swine. *Tierarztl Prax* **18**:483-489.
- Polan, C. E., J. R. Hayes, and T. C. Campbell. 1974. Consumption and fate of aflatoxin B1 by lactating cows. *J. Agric. Food Chem.* **22(4)**:635-638.
- Polychronaki, N., C. P. Wild, H. Mykkanen, H. Amra, M. Abdel-Wahhab, A. Sylla, M. Diallo, H. El-Nezami, and P. C. Turner. 2008. Urinary biomarkers of aflatoxin exposure in young children from Egypt and Guinea. *Food Chem. Toxicol.* **46(2)**:519-526.
- Politis, I., K. Fegeros, S. Nitsch, G. Schatzmayr, and D. Kantas. 2005. Use of *Trichosporon* mycotoxinivorans to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. *Br. Poult. Sci.***46(1)**:58-65.
- Prandini, A., G. Tansini, S. Sigolo, L. Filippi, M. Laporta, and G. Piva. 2009. On the occurrence of aflatoxin M(1) in milk and dairy products. *Food Chem. Toxicol.***47(5)**:984-991.
- Pulina, G., A. Nudda, G. Battacone, and A. Cannas. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* **131(3-4)**:255-291.
- Pussa, T. 2007. Principles of food toxicology. Hardcover ed. CRC Press, Estonian University of Life Sciences, Tartu, Estonia

## R

- Ramos, A. J., J. FinkGremmels, and E. Hernandez. 1996. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.***59(6)**:631-641.

- Rao, S. B. N. and R. C. Chopra. 2001. Influence of sodium bentonite and activated charcoal on aflatoxin M-1 excretion in milk of goats. *Small Ruminant Res.***41(3)**:203-213.
- Raymond, S. L., T. K. Smith, and H. V. L. N. Swamy. 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim. Sci.***81(9)**:2123-2130.
- Raymond, S. L., T. K. Smith, and H. V. L. N. Swamy. 2005. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, metabolism, and indices of athletic performance of exercised horses. *J. Anim Sci.***83(6)**:1267-1273.
- Refai, M. K., Z. M. Niazi, N. H. Aziz, and N. E. M. Khafaga. 2003. Incidence of aflatoxin B1 in the Egyptian cured meat basterma and control by  $\gamma$ -irradiation. *Food / Nahrung* **47(6)**:377-382.
- Ribelin, W. E., K. Fukushima, and P. E. Still. 1978. Toxicity of ochratoxin to ruminants. *Can. J. Comp. Med.***42(2)**:172-176.
- Ringot, D., A. Chango, Y.-J. Schneider, and Y. Larondelle. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem.-Biol. Interact.* **159(1)**:18-46.
- Roth, A., K. Chakor, E. E. Creppy, A. Kane, R. Roschenthaler, and G. Dirheimer. 1988. Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* **48(3)**:293-308.
- Rotter, R. G., A. A. Frohlich, and R. R. Marquardt. 1989. Influence of dietary charcoal on ochratoxin-A toxicity in leghorn chicks. *Can. J. Vet. Res.-Rev. Can. Rech. Vet.***53(4)**:449-453.

## S

- Sabater-Vilar, M., H. Malekinejad, M. H. J. Selman, M. A. M. van der Doelen, and J. Fink-Gremmels. 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia* **163(2)**:81-90.
- Sabino, M., A. Purchio, and T. V. Milanez. 1996. Survey of aflatoxins B-1, M(1) and aflatoxicol in poultry and swine tissues from farms located in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, Brazil. *Rev. Microbiol.***27(3)**:189-191.
- Sacca, E., D. Boscolo, A. Vallati, W. Ventura, F. Bigaran, and E. Piasentier. 2009. Aflatoxin occurrence in milk and supplied concentrates of goat farms of north-eastern Italy. *J. Sci. Food Agric.***89(3)**:487-493.
- Schneeman, B. O. 1999. Fiber, inulin and oligofructose: Similarities and differences. *J. Nutr.* **129(7)**:1424S-1427S.
- Scudamore, K. A. and C. T. Livesey. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* **77(1)**:1-17.

- Sera, N., K. Morita, M. Nagasoe, H. Tokieda, T. Kitaura, and H. Tokiwa. 2005. Binding effect of polychlorinated compounds and environmental carcinogens on rice bran fiber. *J. Nutr. Biochem.* **16(1)**:50-58.
- Shephard, G. S. 2008. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **25(2)**:146-151.
- Shetty, P. H. and L. Jespersen. 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends Food Sci. Technol.* **17(2)**:48-55.
- Skaug, M. A. 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* **16(2)**:75-78.
- Skrinjar, M., R. D. Stubblefield, I. F. Vujicic, and D. Kelemen. 1992. Contamination of feed and meat, liver and kidney of beef-cattle and lambs with molds and Ochratoxin-A. *Acta Vet.-Beogr.* **42(1)**:35-41.
- Smith, R. B., J. M. Griffin, and P. B. Hamilton. 1976. Survey of aflatoxicosis in farm-animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **31(3)**:385-388.
- Smith, T. K. 1980. Influence of Dietary Fiber, Protein and Zeolite on Zearalenone Toxicosis in Rats and Swine. *J. Anim Sci.* **50(2)**:278-285.
- Spring, P. and M. Privulescu. 1998. Mannanooligosaccharide: its logical role as natural feed additive for piglets. in Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium. Nottingham University Press ed. I. B. i. F. Industry, ed. Lyons TP et Jacques KA.
- Stander, M. A., U. T. Bornscheuer, E. Henke, and P. S. Steyn. 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **48(11)**:5736-5739.
- Stanley, V. G., R. Ojo, S. Woldeesenbet, D. H. Hutchinson, and L. F. Kubena. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* **72(10)**:1867-1872.
- Stevenson, F. J. 1994. Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. John Wiley & Sons ed., New York.
- Steyn, P. S. 1984. Ochratoxins and related dihydro-iso-coumarins. Pages 183-216 in Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification. Betina, V. ed. Elsevier Science New York.
- Stoloff, L., M. J. Verret, J. Dantzman, and E. F. Reynaldo. 1972. Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2(3)**:528-531.
- Stroud, J. S. 2006. The effect of feed additives on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. Page 46 in Graduate Faculty of North Carolina State University. Raleigh: North Carolina State University.

- Stubblefield, R. D., A. C. Pier, J. L. Richard, and O. L. Shotwell. 1983. Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and excrements from cows dosed orally with Aflatoxin-B1. *Am. J. Vet. Res.* **44(9)**:1750-1752.
- Surai, P. E. and J. E. Dvorska. 2005. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. Pages 93-137 in *The mycotoxin blue book*. D. E. Diaz, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Swamy, H. V. L. N., T. K. Smith, E. J. MacDonald, H. J. Boermans, and E. J. Squires. 2002. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim Sci.* **80(12)**:3257-3267.
- Swamy, H. V. L. N., T. K. Smith, E. J. MacDonald, N. A. Karrow, B. Woodward, and H. J. Boermans. 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *J. Anim Sci.* **81(11)**:2792-2803.

## T

- Ta, C. A., J. A. Zee, T. Desrosiers, J. Marin, P. Levallois, P. Ayotte, and G. Poirier. 1999. Binding capacity of various fibre to pesticide residues under simulated gastrointestinal conditions. *Food Chem. Toxicol.* **37(12)**:1147-1151.
- Tangni, E. K. 2003. Occurrence of mycotoxins in beer, exposure assessment for consumers and development of biological detoxification options for the control of ochratoxin A during brewing. UCL, Belgium.
- Tejada-Castaneda, Z. I., E. Avila-Gonzalez, M. T. Casaubon-Huguenin, R. A. Cervantes-Olivares, C. Vasquez-Pelaez, E. M. Hernandez-Baumgarten, and E. Moreno-Martinez. 2008. Biodetoxification of aflatoxin-contaminated chick feed. *Poult. Sci.* **87(8)**:1569-1576.
- Trckova, M., L. Matlova, H. Hudcova, M. Faldyna, Z. Zraly, L. Dvorska, V. Beran, and I. Pavlik. 2005. Peat as a feed supplement for animals: a review. *Vet. Med.* **50(8)**:361-377.
- Trucksess, M. W., J. L. Richard, L. Stoloff, J. S. McDonald, and W. C. Brumley. 1983. Absorption and distribution patterns of aflatoxicol and aflatoxin-B1 and aflatoxin-M1 in blood and milk of cows given aflatoxin-B1. *Am. J. Vet. Res.* **44(9)**:1753-1756.

## V

- Van Herwaarden, A. E. and A. H. Schinkel. 2006. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol. Sci.* **27(1)**:10-16.

- Van Herwaarden, A. E., E. Wagenaar, B. Karnekamp, G. Merino, J. W. Jonker, and A. H. Schinkel. 2006. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* **27(1)**:123-130.
- Varga, J., K. Rigo, and J. Teren. 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **59(1-2)**:1-7.
- Veldman, A., J. A. C. Meijs, G. J. Borggreve, and J. J. Heeresvandertol. 1992. Carry-over of aflatoxin from cows food to milk. *Anim Prod* **55**:163-168.
- Vettorazzi, A., E. Gonzalez-Penas, L. Arbillaga, L. A. Corcuera, and A. L. de Cerain. 2008. Simple high-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for plasma, kidney and liver of rat as a tool for toxicology studies. *J Chromatogr A* **1215(1-2)**:100-106.
- Virdis, S., G. Corgiolu, C. Scarano, A. L. Pilo, and E. P. L. De Santis. 2008. Occurrence of Aflatoxin M-1 in tank bulk goat milk and ripened goat cheese. *Food Control* **19(1)**:44-49.
- Volman, J. J., J. D. Ramakers, and J. Plat. 2008. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol. Behav.* **94(2)**:276-284.

## W

- Waltman, L. 2008. Effect of sequestering agents on aflatoxin in milk of dairy cows fed aflatoxin-contaminated diets. Page 108. Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh: North Carolina State University.
- Wang, J.-S., X. Shen, X. He, Y.-R. Zhu, B.-C. Zhang, J.-B. Wang, G.-S. Qian, S.-Y. Kuang, A. Zarba, P. A. Egner, L. P. Jacobson, A. Munoz, K. J. Helzlsouer, J. D. Groopman, and T. W. Kensler. 1999. Protective Alterations in Phase 1 and 2 Metabolism of Aflatoxin B1 by Oltipraz in Residents of Qidong, People's Republic of China. *J. Natl. Cancer Inst.* **91(4)**:347-354.
- Westlake, K., R. I. Mackie, and M. F. Dutton. 1989. in vitro metabolism of mycotoxins by bacterial protozoal and ovine ruminal fluid preparations. *Anim. Feed Sci. Technol.* **25(1-2)**:169-178.
- Whitlow, L. 2006. Evaluation of mycotoxins binders. Pages 132-143 in Proceedings of the 4<sup>th</sup> mid-atlantic nutrition conference. Zimmermann, N.G., ed, University of Maryland, Timonium, Maryland.
- Wisniewski, J. A., D. E. Moody, B. D. Hammock, and L. R. Shull. 1987. Interlobular distribution of hepatic xenobiotic -metabolizing enzyme-activities in cattle, goats, and sheep. *J. Anim. Sci.* **64(1)**:210-215.
- Wong, Z. A. and D. P. H. Hsieh. 1980. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin-B1 in the monkey, rat, and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **55(1)**:115-125.
- Wu, F. 2007. Measuring the economic impacts of Fusarium toxins in animal feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137(3-4)**:363-374.

Wu, F. and G. P. Munkvold. 2008. Mycotoxins in ethanol co-products: Modeling economic impacts on the livestock industry and management strategies. *J. Agric. Food Chem.* **56(11)**:3900-3911.

Wu, Q., A. Jezkova, Z. Yuan, L. Pavlikova, V. Dohnal, and K. Kuca. 2009. Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab. Rev.* **41(1)**:1-7.

## X

Xiao, H., R. R. Marquardt, D. Abramson, and A. A. Frohlich. 1996. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(2)**:648-655.

## Y

Yegani, M., T. K. Smith, S. Leeson, and H. J. Boermans. 2006. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of broiler breeders. *Poult. Sci.* **85(9)**:1541-1549.

Yiannikouris, A., G. Andre, A. Buleon, G. Jeminet, I. Canet, J. Francois, G. Bertin, and J. P. Jouany. 2004a. Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules* **5(6)**:2176-2185.

Yiannikouris, A., G. Andre, L. Poughon, J. Francois, C. G. Dussap, G. Jeminet, G. Bertin, and J. P. Jouany. 2006. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules* **7(4)**:1147-1155.

Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004b. Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Prot.* **67(6)**:1195-1200.

Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Bertin, G. Jeminet, and J. P. Jouany. 2004c. Alkali extraction of beta-d-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and study of their adsorptive properties toward zearalenone. *J. Agric. Food Chem.* **52(11)**:3666-3673.

Yiannikouris, A., J. Francois, L. Poughon, C. G. Dussap, G. Jeminet, G. Bertin, and J. P. Jouany. 2004d. Influence of pH on complexing of model beta-d-glucans with zearalenone. *J. Food Prot.* **67(12)**:2741-2746.

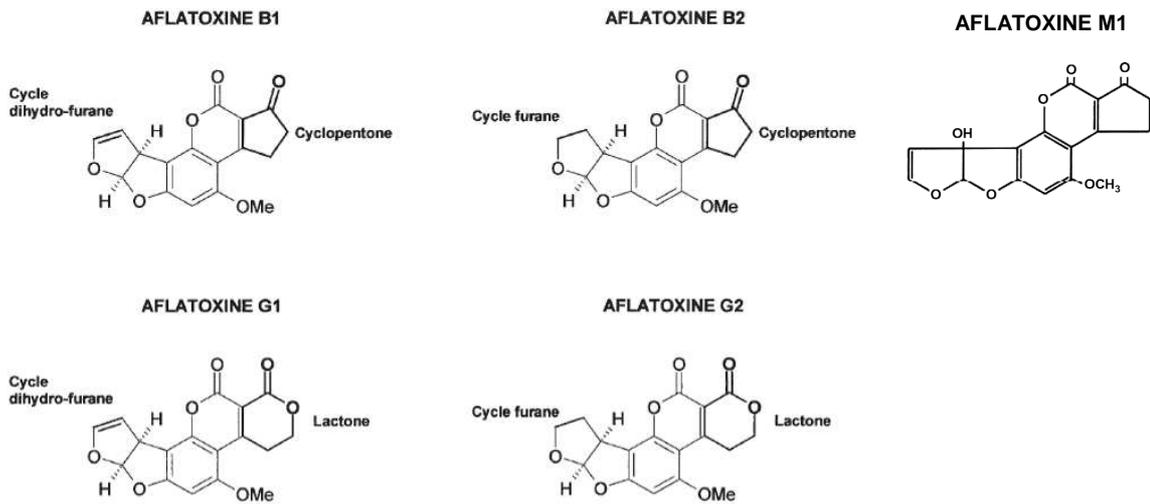
Yiannikouris, A. and J. P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Anim. Res.* **51(2)**:81-99.

Yiannikouris, A., L. Poughon, X. Cameleyre, C. G. Dussap, J. Francois, G. Bertin, and J. P. Jouany. 2003. A novel technique to evaluate interactions between *Saccharomyces cerevisiae* cell wall and mycotoxins: application to zearalenone. *Biotechnol. Lett.* **25(10)**:783-789.

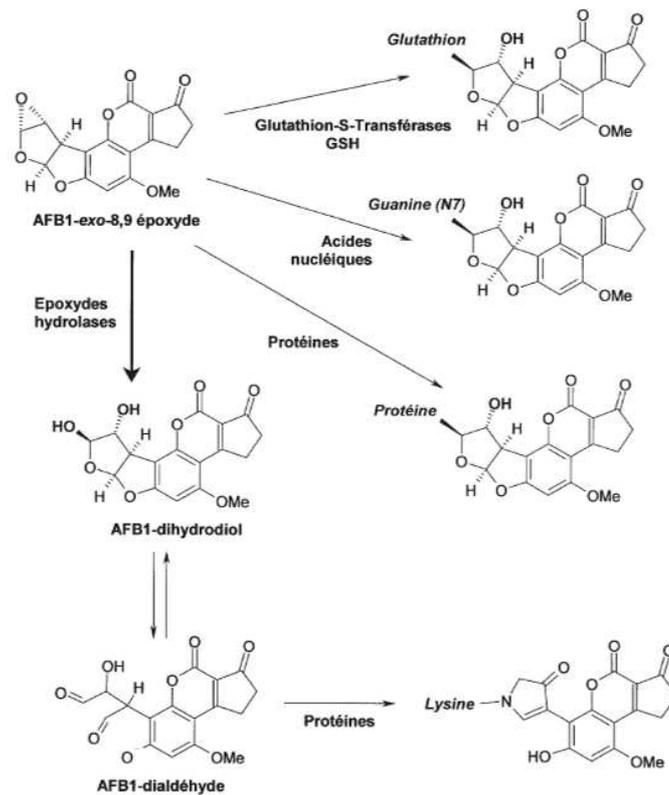
**Z**

- Zaghini, A., G. Martelli, P. Roncada, M. Simioli, and L. Rizzi. 2005a. Mannanligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: Effects on egg quality, aflatoxins B1 and M1 residues in eggs, and aflatoxin B1 levels in liver. *Poult. Sci.* **84(6)**:825-832.
- Zaghini, A., L. Sardi, A. Altafini, and L. Rizzi. 2005b. Residues of aflatoxins B1 and M1 in different biological matrices of swine orally administered aflatoxin B1 and *Saccharomyces cerevisiae*. *Ital. J. Anim. Sci.* **4**:488-490.
- Zaghini, A., M. Simioli, R. Roncada, and L. Rizzi. 2007. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and esterified glucomannan on residues of Ochratoxin A in kidney, muscle and blood of laying hens. *Ital. J. Anim. Sci.* **6**:737-739.
- Zöllner, P. and B. Mayer-Helm. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1136(2)**:123-169.

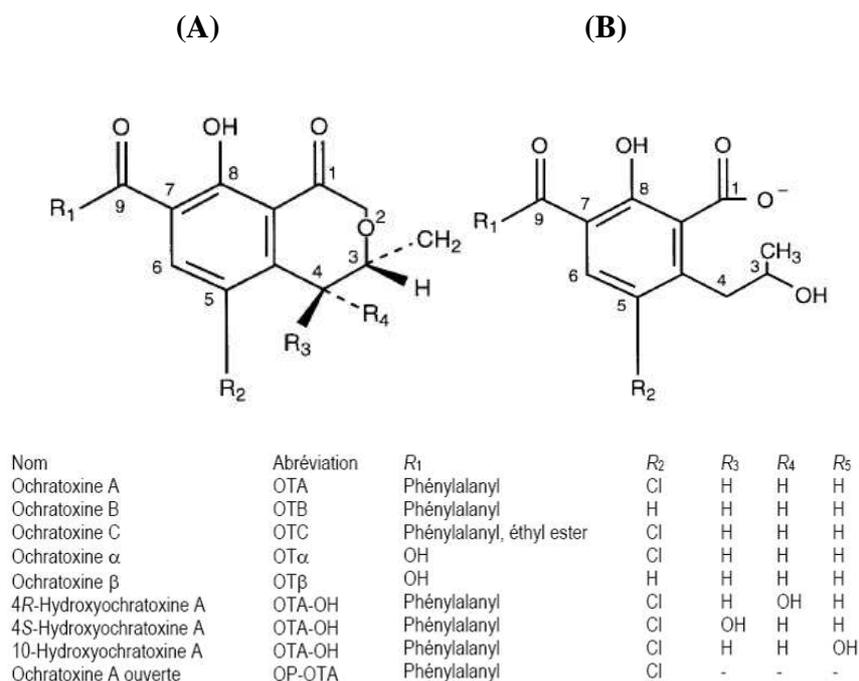
# ILLUSTRATIONS



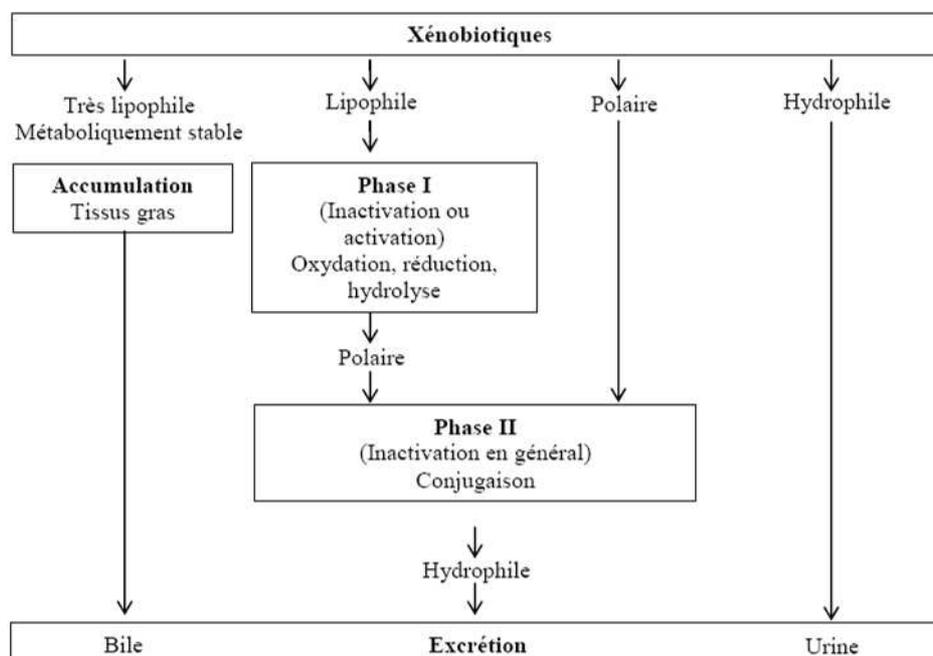
**Figure 1.** Structures chimiques des aflatoxines B1, B2, G1, G2 et M1.



**Figure 2.** Bioconversion du 8,9-époxyde-AFB1.  
 (Guengerich et al., 1996)



**Figure 3.** Structure chimique des différentes ochratoxines et de leurs métabolites (A) et de la forme ouverte de l'ochratoxine A (B). (D'après l'AFSSA, 2009)



**Figure 4.** Toxicocinétique des xénobiotiques. (Pussa, 2007)

Toxine	Voie de bioconversion	Substrat	Produit de réaction	Toxicité	Références
AFB1	Oxydation	AFB1	Epoxyde	+++	(Guerre et al., 1996b)
			AFM1	++	
			AFP1	++	
			AFQ1	+	
	Réduction		AFL	++	
	Conjugaison	Epoxyde	GSH-Epoxyde	-	
		AFM1	Glucurono-AFM1	-	
		AFP1	Glucurono-AFP1	-	
AFQ1		Glucurono-AFQ1	-		
OTA	Oxydation	OTA	4OH-OTA	++	(Creppy et al., 1983)
	Hydrolyse		OT $\alpha$	-	(Ringot et al., 2006)

**Tableau 13.** Voies majeures de bioconversion de l'AFB1 et de l'OTA et toxicité dans les systèmes biologiques.  
(D'après Galtier, 1999)

**(A)**

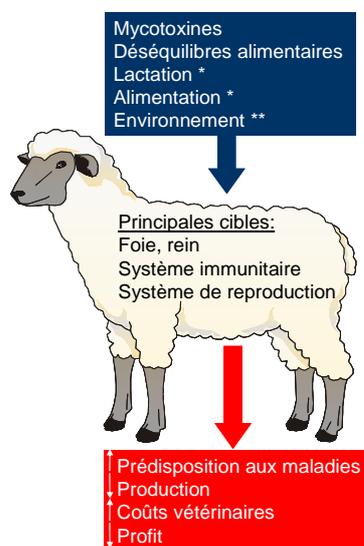
Types d'aliments	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Toutes les matières premières des aliments pour animaux	20
Aliments complets pour bovins, ovins et caprins à l'exception de :	20
- aliments complets pour bétail laitier	5
- aliments complets pour veaux et agneaux	10
Aliments complets pour porcs et volailles ( à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complets	10
Aliments complémentaires pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments complémentaires pour bétail laitiers, veaux et agneaux)	20
Aliments complémentaires pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)	20
Autres aliments complémentaires	5

**(B)**

Matrice	Teneur maximale en µg/kg (teneur en humidité de 12%)
Matières premières entrant dans la compositions des aliments pour animaux : céréales, produits et sous produits de céréales et fourrages	250
Aliments complémentaires et complets pour :	
- les porcs	50
- les volailles	100

**Tableau 2.** Teneurs maximales tolérées en AFB1 (A) et recommandées en OTA (B) en alimentation animale (en µg/kg).

(D'après les directives européennes 2002/32/CE et 2006/576/CE)



**Figure 5.** Différentes formes de stress subis par les animaux d'élevage.

(D'après Morgavi et al., 2008)

\*Pour les ruminants à haut potentiel de production

\*\* Climat, loges inadaptées, pollution, présence humaine

Produit carné	Echantillons positifs		Références
	Pourcentage (%)	Teneurs (µg / Kg)	
Saucisse de foie allemande	68	<0.01-4.6	(Gareis and Scheuer, 2000)
Paté à base de foie de porc espagnol	4.8	<1.77	(Jimenez et al., 2001)
Viande et rein de porc danois	-	0-15 0-2.9	(Jorgensen and Petersen, 2002)
Muscle - rein de porc italien	77-100	0.005-<1	(Matrella et al., 2006)
Saucisse à base de porc italienne	40	0.006-1	(Monaci et al., 2005)
Jambon italien	30-70	0.06-12.51	(Dall'Asta et al., 2010)
Jambon italien	-	<2.3	(Chiavaro et al., 2002)

**Tableau 3.** Présence des ochratoxines dans les produits carnés en Europe.

Mycotoxine	Produit laitier	Echantillons Positifs		Références
		Pourcentage (%)	Teneurs (µg / Kg)	
Aflatoxines	Lait de vache français	3.4	<0.026	(Boudra et al., 2007)
	Lait UHT de vache, Yoghourt espagnol	94.4 3	0.029 0.0132	(Cano-Sancho et al., 2010)
	Lait de vache, Poudre de lait, Yoghourt italien,	86 84 80	0.001-0.108 0.001-0.101 0.001-0.496	(Galvano et al., 1998)
	Yoghourt portugais	19	0.019-0.098	(Martins and Martins, 2004)
	Fromage italien au lait: - de brebis - de vache - de chèvre	12.8 27.2 16.7	0.05-0.215 0.05-0.16 0-0.25	(Montagna et al., 2008)
	Poudre de lait espagnol pour enfant	37.7	0.006- 0.0116	(Gomez-Arranz and Navarro-Blasco)
	Poudre de lait italien pour enfant	1	<0.025	(Meucci et al., 2010)
	Lait de chèvre italien	34	0.003-0.05	(Sacca et al., 2009)
	Lait brut italien Fromage de chèvre	17.3 9.8	0.005- 0.0361 0.079-0.389	(Viridis et al., 2008)
	Lait de brebis italien	81	0.002-0.108	(Bognanno et al., 2006)
	Ochratoxines	Lait de vache norvégien	12.7	0.011-0.058
Lait bovin français		1.1	<0.008	(Boudra et al., 2007)
Lait bovin suisse		14	0.01-0.04	(Breitholtzemanuelsson et al., 1993)
Poudre de lait italien pour enfant		72	0.035-0.689	(Meucci et al., 2010)
Fromages italiens et français		32	0.1-3	(Dall'Asta et al., 2008)

**Tableau 4.** Présence des aflatoxines et des ochratoxines dans le lait et les produits laitiers en Europe.

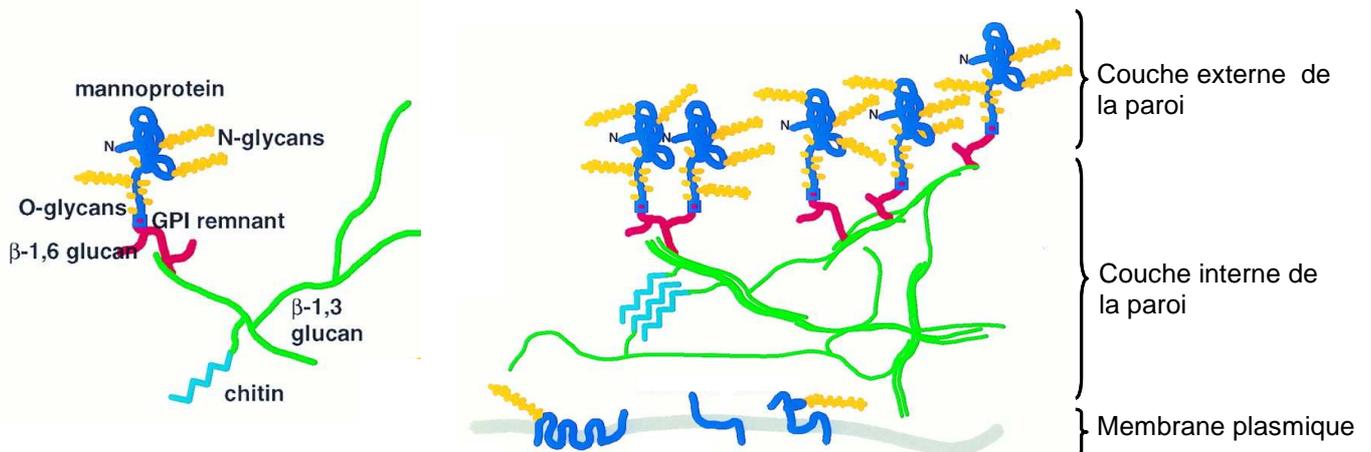
Mycotoxine	Action toxique	Pathologie	Références
Aflatoxines	Carcinogène	Hépatocarcinome	Galvano et al., 2005
	Hépatotoxique	Syndrome de Reye	
	Hépatotoxique	Kwashiorkor	
Ochratoxines	Carcinogène	Cancer des testicules	Sava et al., 2006
	Néphrotoxique	Néphropathies des Balkans	
	Neurotoxique	Maladies neurodégénératives (Maladie de Parkinson et d'Alzheimer)	

**Tableau 5.** Pathologies chroniques humaines associées à la contamination alimentaire par les aflatoxines et les ochratoxines.

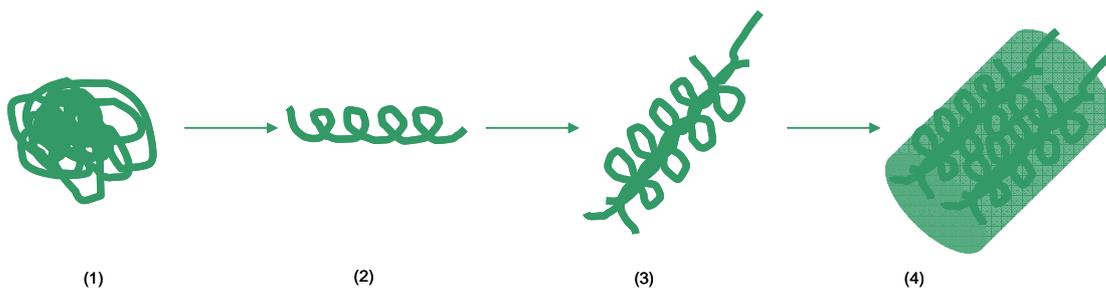
Macromolécule	% de la masse de la paroi	Mr moyenne (DP*) (kDa)
Mannoprotéines	30–50	Variable
$\beta$ -(1,6)-D-glucanes	5–10	24 (150)
$\beta$ -(1,3)-D-glucanes	30–45	240 (1500)
Chitine	1.5–6	25 (120)

**Tableau 6.** Macromolécules de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*.

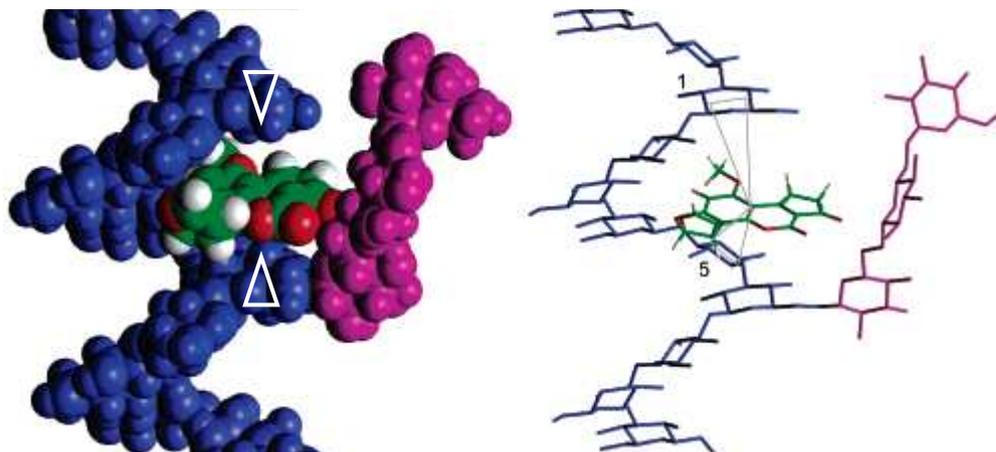
\*(DP) Degré de polymérisation  
(D'après Kliss et al., 2006)



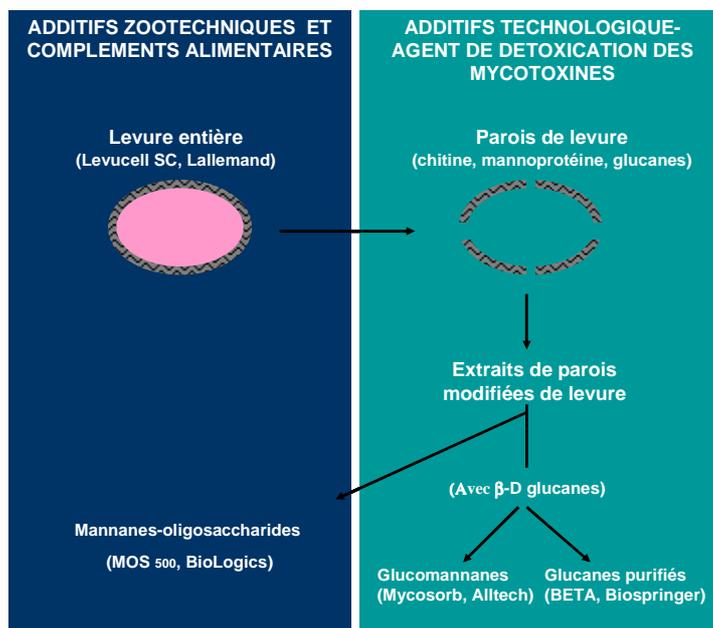
**Figure 6.** Vue schématique de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*. (D'après Lipke and Ovalle, 1998)



**Figure 7.** Les conformations des  $\beta$ -glucanes dans l'espace. Structure en pelote (1), simple hélice (2), triple hélices (3) et multimères de triple hélices (4).



**Figure 8.** Modélisation de l'interaction entre une molécule d'AFB1 avec une molécule de  $\beta$ -(1,3)-D-glucanes en simple hélice au niveau d'un branchement de trois unités glucopyranosyles en  $\beta$ -(1,6)-D-glucanes. (Adapté de Yiannikouris *et al.*, 2006). Les flèches blanches indiquent l'effet de tassement.



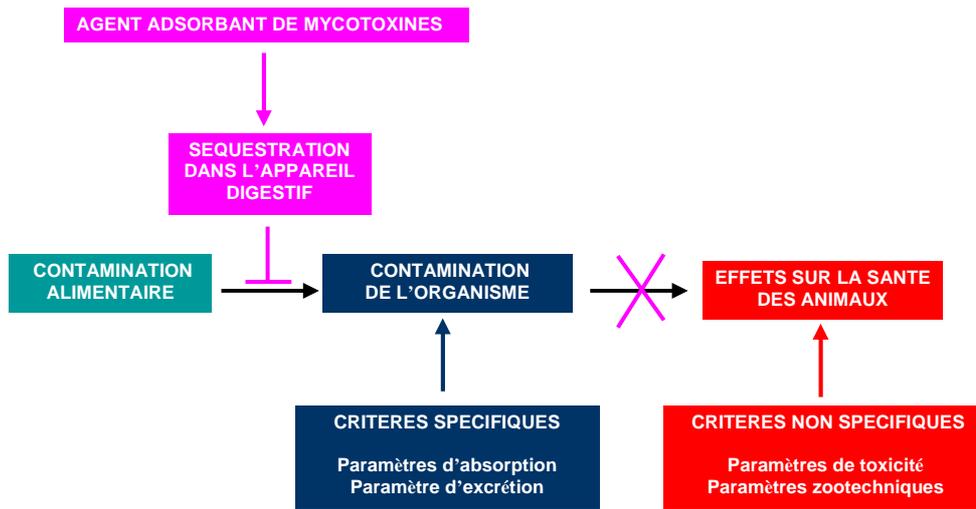
**Figure 9.** Exemples de préparations contenant des parois de levure et leur application en alimentation animale.

<b>Mycotoxine</b>	<b>Pourcentage de mycotoxines adsorbées</b>
Aflatoxines totales	95.0
Fumonisines	67.0
ZEN	77.0
T2	33.4
Citrinine	18.4
DAS	12.7
DON	12.6
OTA	12.5
NIV	8.2
Fusariotoxines	7.9

**Tableau 7.** Capacité du Mycosorb à lier les mycotoxines.  
(D'après Devegowda, 2000)

Espèce animale	Dose d'adsorbant (%)	Mycotoxine	Exposition Niveau (ppb/jour)	Durée (jours)	Paramètre d'évaluation	Symptômes d'intoxication		Références
						Signes atténués	Signes persistants	
Porc	0.2	AFB1	0.385-1.912	Pure 28	Biochimie du plasma Biochimie du foie Histologie Immunité Zootechnie	↑ activité γGT, ALP ↓ cholestérol, glucose ↓ activité P450 EROD et 6βtestostérone hydroxylase ↑ lésions hépatiques ↓ lymphoprolifération	↓ albumine    ↓ GPV	Messonnier et al., 2009
Vache laitière	0.5	AFB1	0.17	N 6	Zootechnie		↓ PA	Stroud et al., 2006
Poulet	0.1	AFB1	2	35	Zootechnie	↓ PV et ↑ RCA		Girish et al., 2006
Poulet	0.05-1.5	AFB1	0.184	N 42	Zootechnie	↑ mortalité	↑ PV, ↓ RCA	Kamalzah et al., 2009
Poulet	0.1-0.5	AFB1	2		Examen des Organes	Changements du poids du foie, reins, thymus, rate, bourse de Fabricius		Karaman et al., 2005
Poulet	0.1	AFB1	2	35	Examen des Organes  Immunité	↓ poids du thymus, bourse de Fabricius ↑ poids du foie, reins, rate, gésier ↓ anticorps anti-NV et IBV		Girish et al., 2006
Poulet	0.075	AFB1/AFB2/AFG1/AFG2	1.66/0.08/0.2/0.04	N 21	Biochimie du plasma	↓ céruléoplasmine	↓ albumine, vitamine A,C,E, b-carotène ↑ MDA	Cinar et al., 2008
Vache laitière	0.5	AFB1	0.17	N 6	Zootechnie		↓ PA	Stroud et al., 2006

**Tableau 8.** Evaluation de l'efficacité de détoxification de l'AFB1 par le Mycosorb chez les principales espèces d'animaux d'élevage.



**Figure 10.** Evaluation de l'efficacité de détoxification des mycotoxines par un agent adsorbant.

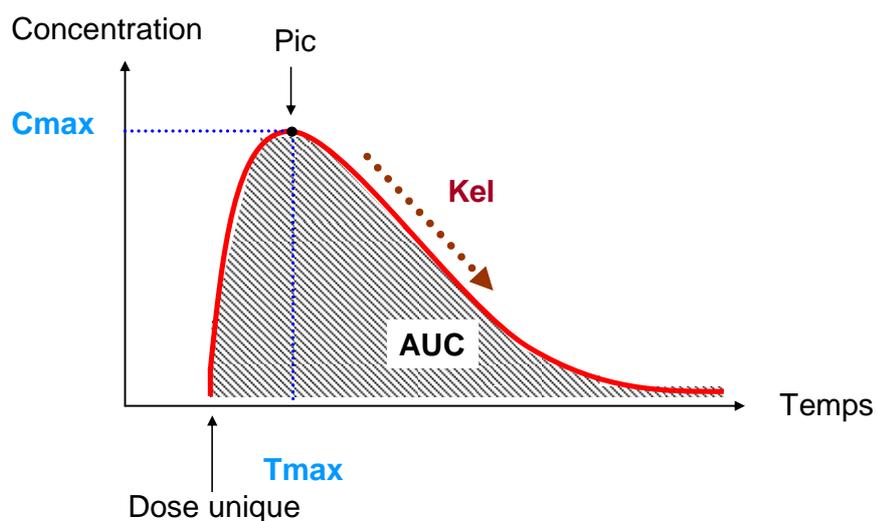
**Paramètres zootechniques:**

- Poids des organes (foie, rein, rate cœur, gésier)
- Poids vif (PV), gain de poids vif (GPV), prise d'aliment, ratio de conversion alimentaire (RCA)
- Mortalité/morbidité
- Production et qualité du lait (taux butyreux (TB), taux de glycérides (TG), taux protéique (TP), numération des cellules somatiques mammaires (SC))

**Paramètres toxicologiques:**

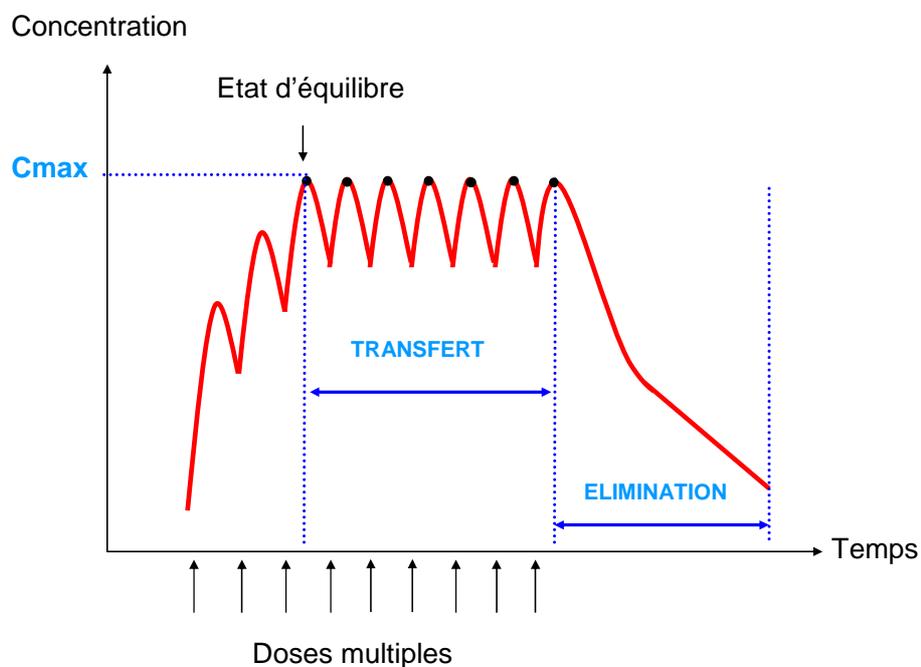
- Histologie du foie et des organes cibles (reins, intestins)
- Hématologie : numération sanguine, mesure de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine
- Biochimie du sérum : titre des protéines totales, albumine, globulines, glucose, acide urique, cholestérol, bilirubine, phosphate inorganique, magnésium, immuoglobulines (Ig A, Ig G, Ig M), mesure des activités enzymatiques (glutamate déshydrogénase,  $\gamma$ -glutamyl transférase, aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase, lactate déshydrogénase, créatine kinase,  $\alpha$ -hydroxybutyrate déshydrogénase)
- Immunité: réaction immunitaire de l'hôte après stimulation vaccinale, infectieuse ou chimique (titre d'anticorps, réponse lymphoproliférative, production de cytokines)

**Encadré 1.** Quelques paramètres zootechniques et toxicologiques utilisés pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de détoxification des mycotoxines par un adsorbant.



Paramètre toxicocinétique	Définition	Unité
Cmax	Concentration maximale relevée durant l'étude cinétique	ng*mL <sup>-1</sup>
Tmax	Temps nécessaire pour atteindre la Cmax	min
AUC	Surface sous la courbe des concentrations en fonction du temps	min*ng*mL <sup>-1</sup>
Kel	Constante d'élimination	min <sup>-1</sup>

**Figure 11.** Les principaux paramètres toxicocinétiques sanguins utilisés pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de détoxification des mycotoxines par un adsorbant.



Paramètres d'excrétion	Définition	Unité
Cmax	Concentration maximale relevée à l'état d'équilibre	ng*L <sup>-1</sup>
Paramètres de transfert	Taux d'AFM1 excrété en 24h dans le lait produit durant la période d'exposition	ng, ng*L <sup>-1</sup> , % de dose d'AFB1
Paramètres d'élimination	Taux d'AFM1 mesuré dans le lait collecté après l'arrêt du traitement	ng, ng*L <sup>-1</sup>

**Figure 12.** Les paramètres d'excrétion de l'AFM1 dans lait utilisés pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de détoxification de l'AFB1 par un adsorbant chez le ruminant laitier.

Espece animale	Parois de levure		Mycotoxine	Exposition Niveau (ppb/jour)	Source	Durée (jours)	Symptômes d'intoxication		Références
	Type	Dose (%)					Signes atténués	Signes persistants	
Poule pondeuse	GM	0.2	OTA	0.2	Pure	84		OTA dans le plasma, les reins, les muscles	Zaghini et al., 2007
Porc (démarrage)	GM (MTB-100)	0.2	AFB1	0.385-1.912	Pure	28		Adduits d' AFB-albumine dans le plasma	Messonnier et al., 2009
Vache laitière	GM (MTB-100)	0.5	AFB1	0.17	N	6		AFM1 dans le lait	Stroud et al., 2006
Vache laitière	GM (Mycosorb)	<b>150 g</b>	AFB1	<b>108 µg</b>		Unique	↓ AFM1 dans le lait		Moschini et al., 2008
Vache laitière	GM (Sc 1026)		AFB1	0.00345	N	3	↓ AFM1 dans le lait		Masoero et al., 2007
Vache laitière	GM (Sc 1026, MTB-100)	0.5	AFB1/AFB2/AFG1/AFG2	0.1/0.0036/0.057/0.0017	A	7		AFM1 dans le lait	Kutz et al., 2009
Vache laitière	Oligosaccharides	10-50g	Aflatoxines					AFM1 dans le lait	Waltman et al., 2008
Vache laitière	GM (Sc, MTB-100)	0.05	AFB1/AFB2/AFG1/AFG2	0.055/0.040/0.002/0.003	N	10	↓ AFM1 dans le lait		Diaz et al., 2004

**Tableau 9.** Evaluation *in vivo* de l'efficacité de détoxification des aflatoxines et de l'OTA par des préparations à base de parois de levures par la mesure des paramètres spécifiques.

Aflatoxine	Matrice	Traitement de l'échantillon	Analyse	Récupération	LOD	Référence
AFM1	Urine	Ns	LC/MS/MS	Nd	Nd	Egner et al ., 2003
AFM1 - AFB1	Urine	Lyophilisation/IAC	HPLC/FLD	96-100%	6.8 -18 pg/ml	Kussak et al ., 1995
AFM1 – AFB1	Urine	SPE/IAC	HPLC/FLD	42-33%	Nd	Polychronaki et al., 2008
AFM1	Urine - fèces	LLE	HPLC/FLD	88%	Nd	Mykkänen et al., 2005
AFM1 - AFB1	Urine	IAC	HPLC/DAD	Nd	Nd	Groopman et al., 1985
AFM1 - AFB1	Urine - fèces	SPE/IAC – IAC	HPLC/FLD	Nd	Nd	Gratz et al., 2006
AFM1	Urine	SPE	LC/MS	Nd	Nd	Scholl et al., 1996
AFM1	Urine	IAC	HPLC/DAD	90-98%	Nd	Wang et al., 1999

**Tableau 10.** Récapitulatif des procédures analytiques développées pour analyser l'AFB1 et l'AFM1 dans l'urine et les fèces.

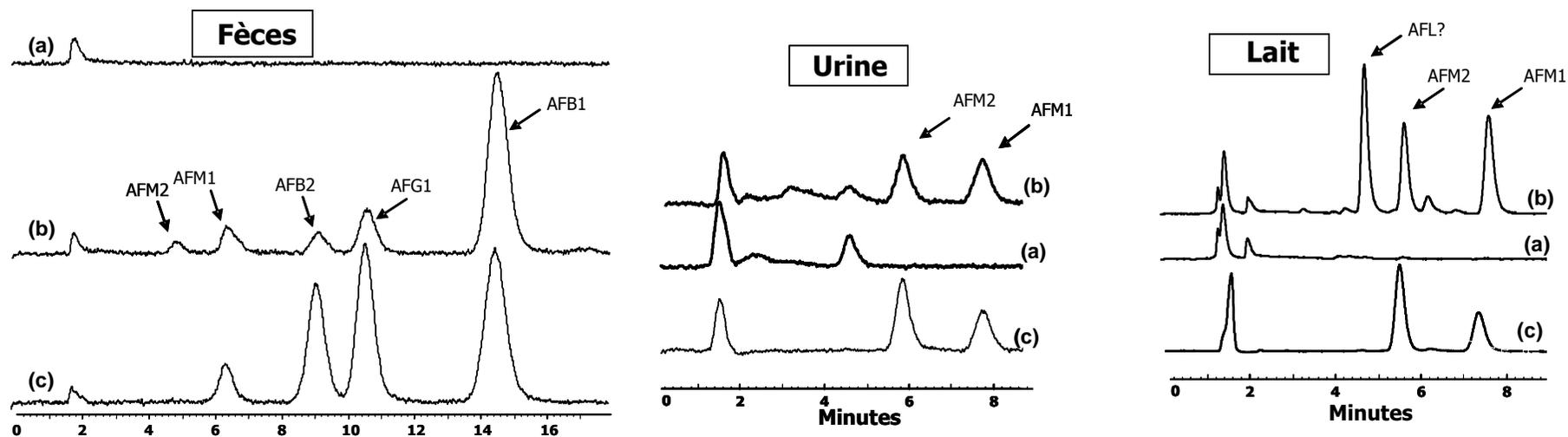
Ns : Non spécifié

Nd : Non déterminé

Matrice	Phase mobile		Débit de pompe (mL/min)	Volume injecté ( $\mu$ l)	Volatge (Volt)	$\lambda$ excitation (nm)	$\lambda$ émission (nm)	Temps de Rétention (min)
	Solvant	(Volume,%)						
Urine	Acétonitrile	17.5	1	50	800	366	438	AFM1 : 7.5
	Méthanol	17.5						
	Eau	64						
	Acide acétique	1						
Fèces	Isopropanol	10	1	50	900	366	438	AFM1 : 6.5 AFB1 : 15
	Acétonitrile	10						
	Acide acétique	2						
	Eau	78						
	PBPB (50mg/L)*	0.3*						
Lait	Acétonitrile	25	1	50	800	366	438	AFM1 : 7
	Eau	75						

**Tableau 11.** Conditions analytiques utilisées pour le dosage des aflatoxines B1 et M1 par CLHP-FLD.

\* Système de dérivation en sortie de colonne

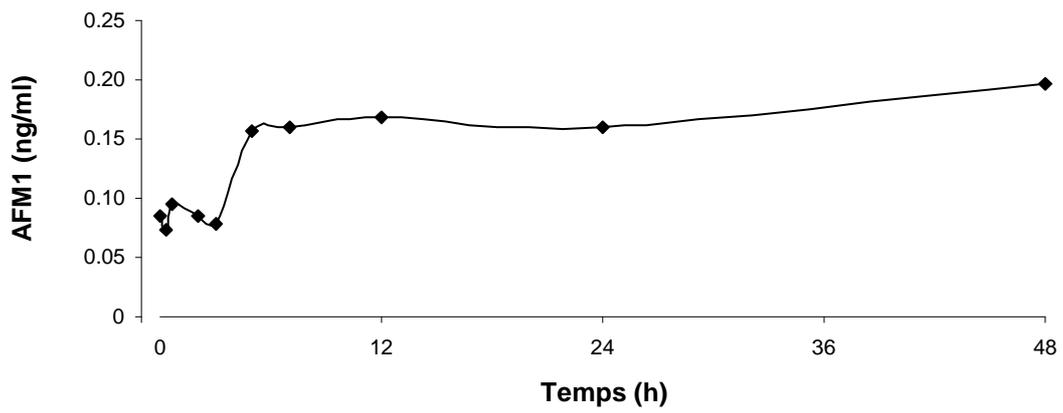


**Figure 13.** Chromatogrammes obtenus par CLHP-FLD d'extraits de fèces, d'urine et de lait d'un animal analysés (a) avant et (b) après exposition à de l'aliment contaminé en aflatoxines. (c) solutions d'aflatoxines pures en mélange.

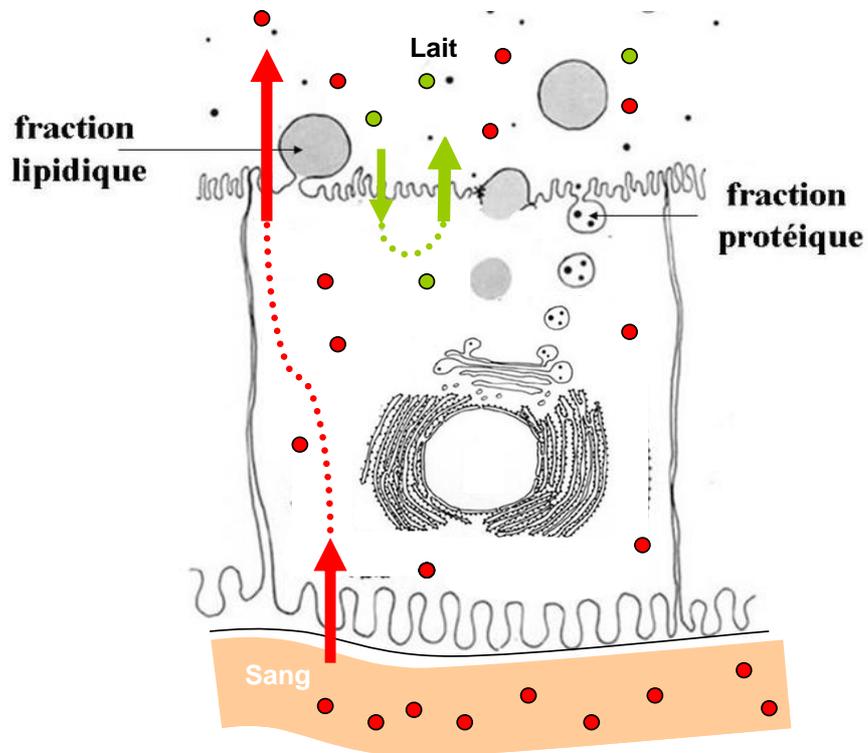
Mycotoxine	Matrice	Domaine de linéarité (ng/ml)	Droite d'étalonnage	r <sup>2</sup>	Limite de quantification <sup>a</sup>	Concentration des CQ (ppb)	Récupération (%)	Précision (%)	Exactitude (%)	Stabilité (mois)	
										3	6
AFM1	Urine	1-20	Y= 156313X-8828	0.9996	0.85ng/ml	2 6	99 84	3.0 2.4	2	2.24 4.30	1.9 4.5
	Fèces	0.5-20	Y= 423749X-126853	0.9992	0.5ng/g	2 4	97 89	6.4 10.3	2.8 -3	1.91 3.54	
	Lait	1-50	Y= 13181X-1885	1.000	5.4 pg/ml	0.05 1	85 85	4.0 4.9	-6 -13	0.04 0.85	0.05 0.89
AFB1	Fèces	0.5-20	Y= 2471734X-726638	0.9994	0.5ng/g	2	103	9.7	-2.6	1.94	
						4	88	6.4	-14	3.67	

**Tableau 12.** Critères de performance des méthodes CLHP utilisées pour la quantification de l'AFB1 et l'AFM1 dans l'urine, les fèces et le lait

<sup>a</sup>Ratio signal/bruit de fond=10



**Figure 14.** Profil de distribution de l'AFM1 dans plasma d'une brebis exposée à de l'AFB1 obtenu par CLHP.



**Figure 15.** Mécanisme général de l'excrétion lactée des aflatoxines. Diffusion passive (→) et transport actif transmembranaire (→).

# **ANNEXES**

 <b>Laboratoire des MYCOTOXINES</b> <b>URH-DIMA</b>	<b>MODE OPERATOIRE NORMALISE</b>	
	Réf : <b>ANAL-Mycotox-12</b>	
	Modifiée le	
Version finale		
<b>OBJET: Méthode de dosage par CLHP et détection Fluorimétrique de l'aflatoxine M1 dans les urines</b>		
Auteur du document: H. Boudra, S. Firmin		Date et signature
Validation: D. Alvarez		Date et signature
Responsable d'Equipe		Date et signature
<b><u>DESTINATAIRES</u></b>		
<input type="checkbox"/> Secrétariat <input checked="" type="checkbox"/> Technicien(s) <input checked="" type="checkbox"/> Stagiaire(s) <input checked="" type="checkbox"/> Responsable(s)		

## I- MATERIELS ET REACTIFS

### 1. Matériels

- |  |   |
|--|---|
| ◆ Appareil à Eau Milli-Q                   | Réf : Elgastat UHQ  |
| ◆ Colonne CLHP n°22<br>150 x 4.6 mm, 3 µm) | Réf : NUCLEODUR C18 Pyramid (MN,  |
| ◆ Mini colonne pour purification IAC       | Réf : AflaprepM (R-Biopharm)  |
| ◆ Pipettes automatiques calibrées          | Réf : 20-200µl Ep Research 4924052<br>Réf : 100-100µl Ep Research 3372931<br>Réf : 500-5000µl Ep Research 4691502 |
| ◆ Tubes PP (7ml)                           | Réf : 000-2053-IRI (Elkay)  |
| ◆ Tubes PP (15 ml)                         | Réf : Falcon 352096   |

### 2. Réactifs et solvants

- |  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. Acétonitrile                                | Réf : Chromanorm, 20 049-322  |
| 2. Azide de sodium                             | Réf : 937074 249              |
| 3. Méthanol                                    | Réf : Chromanorm, 20 834-291  |
| 4. AFM1  | Réf : Sigma Aldrich           |
| 5. Solution d'Azide de Na 0.02 g/l dans le PBS | Réf : 937074 249              |
| 6. Tampon PBS à pH 7.4                         | Réf: Delta Biological, 1000-3 |
| 7. Urines de <b>BREBIS</b> :                   | Cf point III.1.2              |

## II- METHODES :

### 1- Préparation de la gamme de calibration

**SS1 Sigma** : Un aliquote de **0,1** mg de poudre est dissous dans 1ml d'acétonitrile. Cette solution a été vérifiée en réalisant un Scan entre 200 et 400 nm. **MON-04-Calibration-mycotox**

La solution SS1 a été contrôlée à 6.56µg/ml (fiche gestion AFM1)

**SS2 à 2 µg/ml:**        **600µl SS1+1368µl d'ACN (le 03-04-2009)**

**ST1 à 200 ng/ml:** dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la SS2: 200 µl SS2 + 1800 µl d'ACN

Ces solutions sont conservées à -20°C.

### 1.2. Préparation de la gamme de calibration

Dans des flacons en PP (7 ml), des dilutions successives ont été réalisées dans la phase mobile pour obtenir les concentrations suivantes :

S fille	[C] en ng.ml <sup>-1</sup>	Sol. Toxine		MeOH 75%
			vol. (µl)	
SF 1	0.5	SF 4	200	1800
SF 2	1	SF 4	400	1600
SF 3	2	SF 5	400	1600
SF 4	5	SF 5	1000	1000
SF 5	10	ST1	100	1900
SF6	20	ST1	200	1800

Ces solutions sont conservée à +4°C.

- *Toutes ces solutions sont recouvertes de papier aluminium, l'AFM1 est sensible à la lumière*
- *Laisser les solutions revenir à T°C ambiante avant de faire les dilutions et d'utiliser la gamme.*
- *Eviter de laisser traîner les solutions sur la paillasse. Après usage, bien les boucher et les sertir avec du parafilm et les remettre à +4°C.*

### III- VALIDATION :

#### 1- Préparation des QC:

Deux QC surchargés à 2 niveaux de concentration connus (QC1= 2 ng.ml<sup>-1</sup>; QC2= 6 ng.ml<sup>-1</sup>) ont été utilisés pour évaluer les critères de validation suivants : le **Rendement d'extraction** et la **Stabilité** pendant la conservation.

**NB** : Une évaluation de la stabilité de la gamme de calibration (solution pure) sera également réalisée

#### 1.1. Préparation des solutions de contamination

Les solutions filles ont été préparées comme suite:

- **Solution de contamination à 30 ng.ml<sup>-1</sup>**: 82.5µl de SS2 à 2µg/ml + 5417.5µl d'ACN 10%.
- **Solution de contamination à 90 ng.ml<sup>-1</sup>**: 247.5µl de SS2 à 2µg/ml + 5252.5µl d'ACN 10%.

#### *Volumes à préparer :*

**Préparation du QC1= 2 ng.ml<sup>-1</sup>**: 2 ng/ml \* 75ml = 150 ng à rajouter, soit 5 ml de la solution à 30 ng/ml (on prépare 5.5ml).

**Préparation du QC2= 6 ng.ml<sup>-1</sup>**: 6 ng/ml \* 75ml = 450 ng à rajouter, **soit** 5 ml de la solution à 90 ng/ml (on prépare 5.5ml).

#### 1.2. Préparation des QCs

##### *Nombre de QC à préparer*

a-3QC de chaque le jour de la préparation

b-3QC de chaque à T+ 3mois

c- 3QC de chaque à T+ 6mois

d- 2QC de chaque par jour d'analyse, soit 8 \* 2 = 16

Soit un total de 25 QC

Nous allons donc préparer un total de 35 QC (10 de sécurité) de chaque niveau

### **Besoin en urines**

35QC \* 2ml par QC = 70 ml par QC, nous allons préparer 75 ml

Soit 150 ml d'urines

**Préparation** : Dans un Becher de 250 ml en PP, placé sur un agitateur magnétique, **70 ml d'urines** ont été additionnés de **5 ml** de chacune des solutions de contaminations correspondantes. Les 2 urines ont été maintenues sous agitation permanente pendant au moins 30 min, aliquotées par fraction de **2 ml exactement mesuré** dans des tubes Eppendorff de 15 ml en PP, puis stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse<sup>5</sup>.

- **QC1 à 2 ng.ml<sup>-1</sup> : 70 ml d'urines + 5 ml de la solution à 30 ng.ml<sup>-1</sup>**
- **QC2 à 6 ng.ml<sup>-1</sup> : 70 ml d'urines + 5 ml de la solution à 90 ng.ml<sup>-1</sup>**

### **1.3. Préparation des références :**

2 ml d'urine contaminée sont déposées et reprisent dans 2 ml d'éluat. Nous avons donc la même concentration dans l'urine de départ que dans l'éluat d'arrivé.

Soit :

- QC1 à 2ng/ml : 300µl de la sol de cont à 30 ng/ml + 4200µl de MeOH 75% = sol à 2 ng/ml
- QC2 à 6ng/ml : 300µl de la sol de cont à 90 ng/ml + 4200µl de MeOH 75% = sol à 6 ng/ml

## **2- Validation**

### **2.1. Linéarité:**

Une courbe de calibration sera réalisée pour chaque série d'analyse. Une régression linéaire sera réalisée entre la surface du pic des différentes concentrations d'AFM1 et leur concentration théorique.

### **2.1. Spécificité:**

Elle sera déterminée sur les échantillons d'urine des animaux inclus dans l'expérience. Aucun pic parasite ne doit interférer avec les pics de l'AFM1, et éventuellement des autres métabolites (si on connaît les temps de rétention dans les conditions chromatographiques de cette méthode).

---

<sup>5</sup> L'urine utilisée a reçu de l'azide lors de son stockage en attente de son utilisation.

### **2.3- Rendement d'extraction :**

Le pourcentage d'extraction sera testé sur 2 niveaux de concentration en triplicate. Il sera calculé comme le rapport de la réponse (surface du pic) obtenue après injection de l'échantillon extrait à celle obtenue pour la même quantité d'AFM1 injectée en solution pure (Sans évaporation).

### **2.4-Précision et exactitude de la méthode**

#### **Répétabilité :**

3 QC de chaque niveau de concentration (n=6) seront analysés. Pour chaque niveau de concentration, la précision et l'exactitude devront être inférieure à 20 %.

#### **Reproductibilité :**

La reproductibilité sera testée sur les différentes séries de mesure. Pour chaque niveau de concentration, la précision et l'exactitude devront être inférieure à 20%.

### **2.5 –Stabilité:**

3 QC de chaque niveau de concentration<sup>6</sup> seront analysés immédiatement après leur préparation (avant congélation) = Référence. 2 autres QC de chaque niveau de concentration seront analysés 3 et 6 mois après leur conservation à -20°C.

---

<sup>6</sup> Les mêmes qui auront servi à l'évaluation du rendement et de la répétabilité

## IV. METHODES

### 1. Préparation des échantillons :

Dans un tube falcon PP de 15ml,

Etape	Nature	Volume	Action
1	Urine	2ml	
2	MeOH	1ml	Vortexer 30s.
3	PBS	9ml	Vortexer 5s.
4	Centrifuger le tube à 5000 tr/mn pendant 10 mn. Un culot plus ou moins grand se forme dans le fond du tube.		

### 2. Purification sur mini colonne (Afla Prep M®) :

#### **NB :**

- **Les colonnes IAC et réactifs sont placés à T°C ambiante 1h avant l'extraction**
- La capacité de la colonne IAC sera testée pour chaque nouveau lot sur un échantillon d'urine surchargé avec une concentration correspondant au taux maxi de la colonne, c a d 200 ng.

Action	Solvant	Volume	Débit ( <i>ml/min</i> )
<i>Déposer le mélange (attention de ne pas prendre le culot)</i>		12ml	1ml/mn
<i>Lavage</i>	eau milliQ	10ml	3-4 ml/mn
<i>Séchage à l'air</i>			
<i>Elution (1)</i>	MeOH	1.5ml	Gouttes à gouttes
	Eau UHQ	0.5ml	Gouttes à gouttes

Bien vortexer l'éluat pendant 30 s., aliquoter par fraction de 400µl dans deux vials d'injection et en placer un à +4°C, injecter directement 50µl de l'autre, vérifier les pics et réinjecter une seconde fois si les pics sont corrects.  
Une troisième injection est aussi possible.

(1) Laisser le MeOH traverser la colonne et laisser en contact pendant 1 min, aspirer ensuite pour faire remonter le MeOH dans la colonne avant de commencer à éluer.

**Régénération des colonnes :** Après chaque utilisation, les IAC sont immédiatement lavées avec 10 ml d'ED puis 10 ml de PBS. Elles sont stockées dans une solution d'azide de Na à 0.02% dans le PBS.

### 3. Conditions chromatographiques:

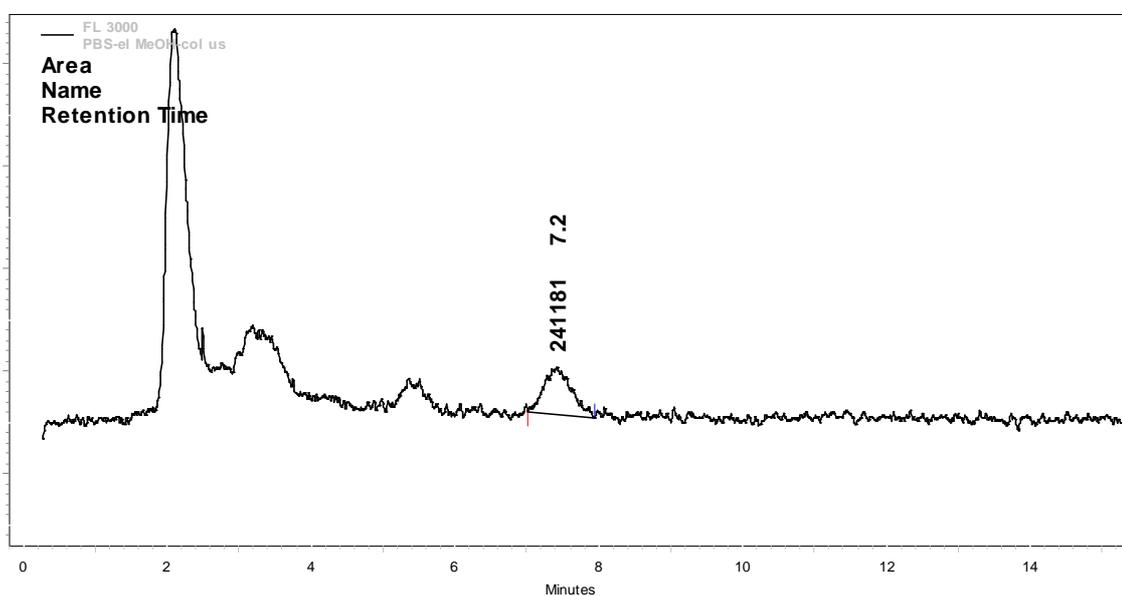
<b>Colonne n° 22</b>	
<b>Volume d'injection</b>	0.05 ml
<b>Phase mobile</b>	<b>A:</b> ACN-MeOH-ED (17.5 : 17.5 : 65) 1 ml/min
<b>Débit</b>	
<b>Détecteur Fluorescence</b>	<b>PMT : 800v</b>

	$\lambda_{ex}$ 366 nm ; $\lambda_{em}$ 438 nm
<b>Four</b>	<b>40°C</b>
<b>Temps d'analyse</b>	<b>11 mn</b>
<b>Tr toxines</b>	<b>AFM1: 7.5 min</b>

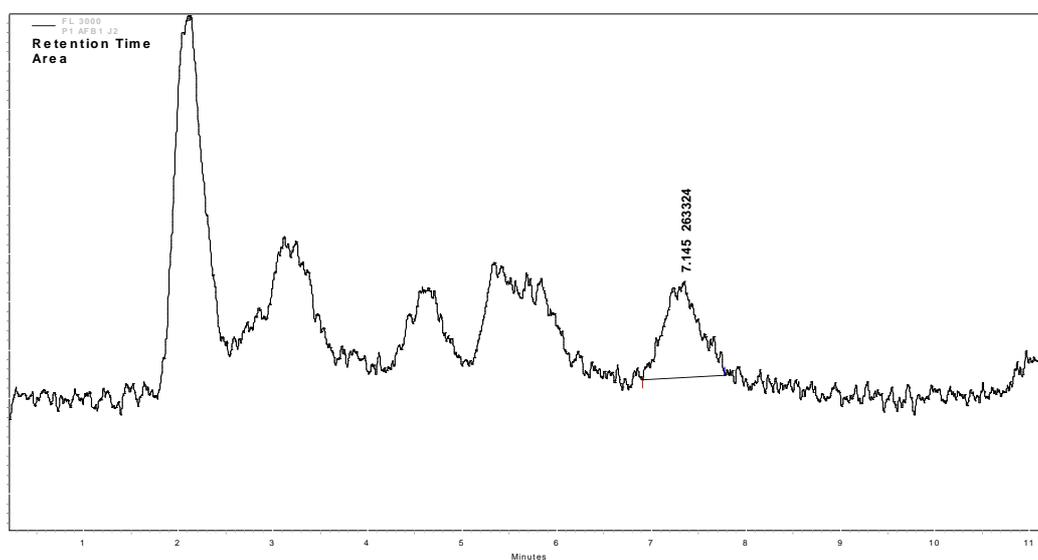
### Expression des résultats:

$$\text{Concentration (ng/ml)} = M(\text{ng})/V(\text{ml})$$

**Figure 1:** Chromatogramme type d'une solution pure d'AFM1 à 2 ng/ml



**Figure 2 :** Chromatogramme type d'AFM1 dans les urines (QC à 2 ng/ml d'urine)



## **V. PROCEDURE DE DECONTAMINATION DU MATERIEL**

(i) Immerger totalement le matériel à décontaminer dans une bassine réservée à cet effet contenant une solution de NaClO (5° CL, ou 5% (v/v)) préparée extemporanément. Le matériel est laissé en contact au moins de 30 minutes. La solution de décontamination est ensuite diluée avec de l'eau de robinet. Le matériel est ensuite lavé au méthanol.

(ii)- Le matériel ainsi traité suivra ensuite le cheminement normal de la vaisselle de laboratoire non contaminée.

(iii)- Le matériel en contact avec une toxine donnée sera d'abord rincée 2 à 3 fois avec de l'eau distillée pour enlever les résidus de détergent, ensuite rincée avec le solvant d'extraction de la toxine correspondante (sinon avec du méthanol).



## II- METHODES :

### 1- Préparation de la gamme de calibration

#### 1.1.1 AFM1

**SS1 Sigma** : Un aliquote de 0,1mg de poudre est dissous dans 1ml d'acétonitrile. Cette solution a été vérifiée en réalisant un Scan entre 200 et 400nm. **MON-04-Calibration-mycotox**

**SS2 à 2µg/ml: 600µl SS1+1368µl d'ACN (03-04-2009)**

**ST1 à 200 ng/ml : dilution au dixième de la solution SS2 : 200µl SS2+ 1800µl d'ACN 100.**

Ces solutions sont conservées à -20°C.

#### 1.1.2 AFB1

**SS1 Sigma** : Un aliquote de 0,1mg de poudre est dissous dans 1ml d'acétonitrile. Cette solution a été vérifiée en réalisant un Scan entre 200 et 400nm. **MON-04-Calibration-mycotox**

**SS2 à 8.9µg/ml: 600µl SS1+1368µl d'EtOH (03-04-2009)**

**ST1 à 400 ng/ml : dilution de la solution SS2 : 89.88µl SS2+ 1912.12µl d'EtOH (06-10-2009).**

Ces solutions sont conservées à -20°C.

#### 1.1.3 AFG1

**SS1 Sigma** : Un aliquote de 0,1mg de poudre est dissous dans 1ml d'acétonitrile : toluène (1 :9). Cette solution a été vérifiée en réalisant un Scan entre 200 et 400nm. **MON-04-Calibration-mycotox**

**SS2 à 10.84 µg/ml: 20µl SS1+1388µl de Tol : ACN (9 :1)(10-10-2009)**

**ST1 à 400 ng/ml : dilution de la solution SS2 : 73.8µl SS2+ 1926.2µl d'ACN.**

Ces solutions sont conservées à -20°C.

#### 1.1.4 AFB2

**SS1 Sigma** : Un aliquote de 0,1mg de poudre est dissous dans 1ml d'acétonitrile : toluène (1 :9). Cette solution a été vérifiée en réalisant un Scan entre 200 et 400nm. **MON-04-Calibration-mycotox**

**SS2 à 6.98µg/ml: 150µl SS1+7781µl de Tol : ACN (9 :1) (10-10-2009)**

**ST1 à 400 ng/ml : dilution de la solution SS2 : 114.6µl SS2+ 1885.4µl d'ACN.**

Ces solutions sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.2.1 Préparation des solutions de toxines en mélange de travail (STM1)

**STM1 à  $40\text{ng.ml}^{-1}$  d'AFB1 et d'AFM1:** 250 $\mu\text{l}$  de la solution ST1 AFB1+ 500 $\mu\text{l}$  de la solution ST1 AFM1+ 1750 $\mu\text{l}$  de MeOH à 75%

### 1.2.2 Préparation des solutions de toxines en mélange de travail (STM2)

**STM2 à  $40\text{ng.ml}^{-1}$  d'AFB2 et d'AFG1:** 75  $\mu\text{l}$  de chacune des solutions ST1 + 1350 $\mu\text{l}$  de MeOH à 75%

### 1.3. Gamme de calibration

Dans des flacons en PP (7ml), des dilutions successives ont été réalisées dans la phase mobile pour obtenir les concentrations suivantes :

S fille	[C] en AFB1 et AFM1 $\text{ng.ml}^{-1}$	[C] en AFB2 et AFG1 $\text{ng.ml}^{-1}$	Sol. Toxine		Methanol 75%
				vol. ( $\mu\text{l}$ )	vol. ( $\mu\text{l}$ )
SF 1	0.5	0.25	SF 2	1000	1000
SF 2	1	0.5	SF 3	1500	1500
SF 3	2	1	STM1/ST M2	200/200	3600
SF 4	5	2	STM1/ST M2	250/200	1550
SF 5	10	3	STM1/ST M2	500/300	1200
SF 6	20	5	STM1/ST M2	1000/500	500

Ces solutions sont conservée à  $+4^{\circ}\text{C}$ .

- Toutes ces solutions sont recouvertes de papier aluminium, l'AFM1 est sensible à la lumière.
- Laisser les solutions revenir à température ambiante avant de faire les dilutions et d'utiliser la gamme.
- Eviter de laisser traîner les solutions sur la paillasse. Après usage, bien les boucher et les sertir avec du parafilm et les remettre à  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### III- VALIDATION :

#### 1- Préparation des QC:

La validation dans ces matrices ne concernera que la **LOQ**, le **Rendement d'extraction** et la **Stabilité** pendant la conservation.

Cette validation sera réalisée avec un type de QC réalisé par une surchargé avec une solution connue en AFM1, AFB1, AFG1 et AFB2.

**NB** : Une évaluation de la stabilité de la gamme de calibration (solution pure) sera également réalisée

#### Nombre de QC à préparer :

**a-3QC de chaque le jour de la préparation**

**b -3QC de chaque à T+3 mois**

**c-3QC de chaque à T+6 mois**

**d-2QC de chaque par jour d'analyse, soit  $8*2=16$**

**Soit un total de 25QCs**

**Nous allons donc préparer un total de 35 QC (10 de sécurité) de chaque niveau**

#### Besoin en fèces

**$35QC*1g$  par QC= 35g par niveau de QC**

**Soit 70 g de fèces de brebis non contaminés.**

#### 1.1. QC obtenu par surcharge

QC1= 2ng.g-1 d'AFM1, AFB1 et 1ng.g-1 d'AFG1, AFB2 de fèces

QC2= 4ng.g-1 d'AFM1, AFB1 et 1.5ng.g-1 d'AFG1, AFB2 de fèces

#### Masse à préparer :

- **QC1**= 2ng.g-1 d'AFM1, AFB1 et 1ng.g-1 d'AFG1, AFB2 \*35g = 70ng d'AFM1, AFB1 et 35ng d'AFG1, AFB2 nécessaire soit 1.75ml de la solution à 40ng.ml-1 d'AFM1, AFB1 et 20ng .ml-1 d'AFG1, AFB2 (on prépare 2.25ml)

- **QC2**= 4ng.g-1 d'AFM1, AFB1 et 1.5ng d'AFG1, AFB2 \*35g = 140ng d'AFM1, AFB1 et 52.5ng d'AFG1, AFB2 nécessaire soit 3.5ml de la solution à 40ng.ml-1 d'AFM1, AFB1 et 15ng.ml-1 d'AFG1, AFB2 (on prépare 4ml)

**Préparation** : Dans un tube (Falcon, PP, 50ml), 1g de fèces lyophilisé est pesé ( $\pm 0.01$ g) sera surchargé avec 50 $\mu$ l et 100 $\mu$ l des solutions filles correspondantes, et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse.

### 1.2. Préparation des solutions de contamination :

Les solutions filles ont été préparées comme suite :

- **Solution de contamination de mycotoxines en mélange STMF1** à 40ng.ml<sup>-1</sup> d'AFM1, AFB1 et 15ng.ml<sup>-1</sup> d'AFG1, AFB2 **pour la préparation du QC1** :

450 $\mu$ l de ST1 AFM1 à 200ng/ml  
+225 $\mu$ l de ST1 AFB1 à 400ng/ml  
+112.5 $\mu$ l de ST1 AFB2 à 400ng/ml  
+112.5 $\mu$ l de ST1 AFG1 à 400ng/ml  
+ 1350 $\mu$ l de MeOH à 75%

- **Solution de contamination de mycotoxines en mélange STMF2** à 40ng.ml<sup>-1</sup> d'AFM1, AFB1 et 15ng.ml<sup>-1</sup> d'AFG1, AFB2 **pour la préparation du QC1** :

800 $\mu$ l de ST1 AFM1 à 200ng/ml  
+400 $\mu$ l de ST1 AFB1 à 400ng/ml  
+150 $\mu$ l de ST1 AFB2 à 400ng/ml  
+150 $\mu$ l de ST1 AFG1 à 400ng/ml  
+2500 $\mu$ l de MeOH à 75%

### 1.3. Préparation des solutions de référence :

1 g de fèces contaminé sont extrait avec 12ml de chloroforme, 9ml d'extrait sont déposés puis repris dans 1ml d'éluat. La concentration de toxines est donc réduite d'un facteur 0.75 ( $=9/12$ ) dans de solution de reprise par rapport à la concentration initiale dans 1g de fèces.

Soit, pour le QC1 à 2ng.g<sup>-1</sup> d'AFM1, AFB1 et 1ng d'AFG1, AFB2, la référence est = sol à 1.5ng /ml d'AFM1, AFB1 et 0.75 ng/ ml d'AFG1, AFB2.

= 112.5  $\mu$ l ( $3*50*0.75$ ) de la solution de contamination STMF1+2887.5 $\mu$ l de MeOH à 75% .

Soit, pour le QC2 à 4ng.g<sup>-1</sup> d'AFM1, AFB1 et 1.5ng d'AFG1, AFB2, la référence est = sol à 3ng /ml d'AFM1, AFB1 et 1.125 ng/ ml d'AFG1, AFB2.

= 225  $\mu$ l ( $3*100*0.75$ ) de la solution de contamination STMF2+2775 $\mu$ l de MeOH à 75% .

## **2- Validation**

### **2.1 Linéarité**

Une courbe de calibration sera réalisée pour chaque série d'analyse. Une régression linéaire sera réalisée entre la surface du pic des différentes concentrations d'aflatoxines et leur concentration théorique.

### **2.2 Spécificité**

Elle sera déterminée sur les échantillons de fèces d'animaux inclus dans l'expérience. Aucun pic parasite ne doit interférer avec le pic d'aflatoxines et éventuellement des autres métabolites (si on connaît les temps de rétention dans les conditions chromatographiques de cette méthode).

### **2.3 Rendements d'extraction**

Le pourcentage d'extraction sera testé sur 2 niveaux de concentration en triplicate. Il sera calculé comme le rapport de la réponse (surface du pic) obtenue après injection de l'échantillon extrait à celle obtenue pour la même quantité d'aflatoxines injectées en solution pure (sans évaporation).

### **2.4 Précision et exactitude de la méthode**

#### Répétabilité :

3 QC de chaque niveau de concentration (n=6) seront analysés. Pour chaque niveau de concentration, la précision et l'exactitude devront être inférieure à 20%.

#### Reproductibilité :

La reproductibilité sera testée sur les différentes séries de mesure. Pour chaque niveau de concentration, la précision et l'exactitude devront être inférieure à 20%.

### **2.5 Stabilité**

3 QC de chaque niveau de concentration (n=6) seront analysés immédiatement après leur préparation (avant leur congélation)= Référence. 2 autres QC de chaque niveau de concentration seront analysés 3 et 6 mois après leur conservation à -20°C.

#### IV. METHODES

##### 1. Extraction des aflatoxines par le chloroforme :

Dans un tube PP de 50ml,

Nature	Volume	Action
<i>Poudre de fèces</i>	1g	
<i>NaCl 1%</i>	4ml	Hydrater, homogénéiser 2min aux Ultra-Sons
chloroforme	12ml	Extraire 20 min sous agitation (V3)
		Centrifuger 10min à 5000 tr/min
<i>culot</i>	9ml	transférer dans un tube PP de 15ml
		Evaporer à sec sous N2 à 50°C
Méthanol 100%	0.5ml	Suspendre les aflatoxines
		Agiter au vortex 1min
PBS	10ml	Diluer le MeOH à 10% du volume d'extrait et ajuster le pH à 7.4
		Centrifuger 10min à 5000 tours/min

##### 2. Purification des aflatoxines sur colonne IAC (Aflaprep®) :

Action	Solvant	Volume	Débit ( <i>ml/min</i> )
<i>Déposer</i>	Extrait de fèces dilué	10.5ml	1ml /min
<i>Lavage</i>	Eau milli Q	10ml	3-4 ml/min
<i>Séchage à l'air</i>			
<i>Première élution</i>	Méthanol 100%	0.75ml	Gouttes à gouttes
			Evaporer à sec sous N2 à 50°C
<i>Hydratation la colonne</i>	Eau MilliQ	0.25ml	Gouttes à gouttes
<i>Séchage à l'air</i>			
<i>Seconde élution</i>	Méthanol 100%	0.75ml	Gouttes à gouttes
L'extrait organique est agité au vortex 1min. 50µl sont injectés			

\*Laisser le méthanol traverser la colonne et laisser en contact pendant 1min lors de la première élution, aspirer ensuite pour faire remonter le méthanol dans la colonne avant de commencer à éluer.

NB : Après chaque utilisation, les IAC sont immédiatement lavées avec 10ml d'eau distillée puis 10ml de PBS. Elles sont stockées dans une solution d'Azide de Na à 0.02% dans le PBS.

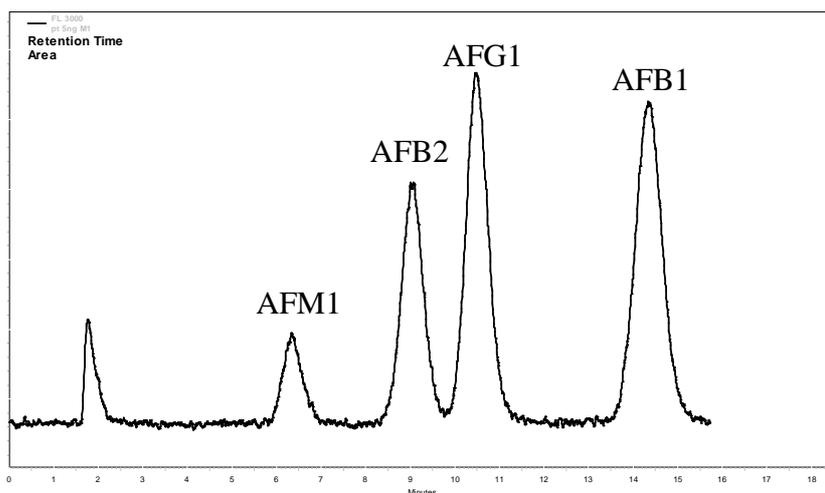
### 3. Conditions chromatographiques: (adapté de Manetta *et al.*, 2005) :

Colonne n° 22	
Phase mobile	ACN/ISOPROPANOL/AA/ED (10:10: 2:78; v:v:v)
Débit	1 ml/min
Température du four	30°C
DPC	PBPB à 0.005%
Débit	0.3ml/min
Détecteur Fluo	PMT : 900 V; $\lambda_{em}$ : 366 nm, $\lambda_{ex}$ : 438 nm
Temps d'analyse	19 min
Tr toxines	AFM1 : 6.5 min AFB2 : 9 min AFG1 :10.5min AFB1 : 15min

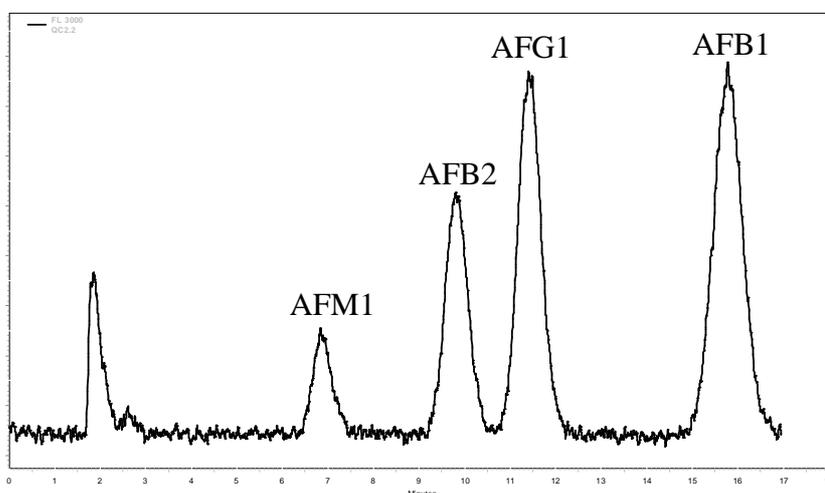
#### Expression des résultats:

Concentration (ng/g) = m(ng)/M (g de fèces)

**Figure 1:** Chromatogramme type d'une solution pure de toxines en mélange (SF5)



**Figure 2 :** Chromatogramme type des toxines dans les fèces obtenu après surcharge (QC2)



## **V. PROCEDURE DE DECONTAMINATION DU MATERIEL**

(i) Immerger totalement le matériel à décontaminer dans une bassine réservée à cet effet contenant une solution de NaClO (5° CL, ou 5% (v/v)) préparée extemporanément. Le matériel est laissé en contact au moins de 30 minutes. La solution de décontamination est ensuite diluée avec de l'eau de robinet. Le matériel est ensuite lavé au méthanol.

(ii)- Le matériel ainsi traité suivra ensuite le cheminement normal de la vaisselle de laboratoire non contaminée.

(iii)- Le matériel en contact avec une toxine donnée sera d'abord rincée 2 à 3 fois avec de l'eau distillée pour enlever les résidus de détergent, ensuite rincée avec le solvant d'extraction de la toxine correspondante (sinon avec du méthanol).

# Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats by a yeast cell wall preparation

S. FIRMIN<sup>1,2</sup>, P. GANDIA<sup>3</sup>, D.P. MORGAVI<sup>1</sup>, J-P. JOUANY<sup>1</sup>, G. HOUIN<sup>3</sup>, G. BERTIN<sup>2</sup> and H. BOUDRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint Genès-Champanelle

<sup>2</sup> Alltech-France, European Regulatory Department, F-92593 Levallois-Perret

<sup>3</sup> Laboratoire Cinétiques des Xénobiotiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-31062 Toulouse cedex 9

## INTRODUCTION

Cell Wall preparations of *Saccharomyces cerevisiae* were shown capable to bind several major mycotoxins in vitro. Most in vivo studies have evaluated the efficacy of the detoxifiers on the basis of animal performances and/or absence of toxicity, but there is scarce information on how they impair absorption. Comparing excretion of mycotoxins in different biological fluids with and without detoxifier administration is a direct way to assess their efficacy. The objective of this study was to evaluate the effect of a commercial yeast cell wall preparation (YCW) on aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) pharmacokinetic and balance excretion (faeces vs urine) in rats.

## MATERIALS AND METHODS

■ Rats (Sprague-Dawley, 265±30 g) were housed in a controlled room and had free access to water and feeds. Radiolabelled AFB1 (0.716 µg/kg BW) and OTA (3.22 µg/kg BW) were orally administered alone or with YCW equivalent to 0.025% in diet.

■ The absorption and excretion of toxins was monitored by radioactivity measurements using a liquid scintillation counter in two different studies.

► **Pharmacokinetic study.** The pharmacokinetic parameters were determined in plasma using three rats per treatment group, sacrificed at 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 24, 36, 48 and 72 h post gavage (n=117).

► **Excretion study.** five rats per group were randomly and individually placed in metabolism cages. Samples of urines and faeces were collected at 6, 12, 24, 36, 48 h, and then every 24 h after dose.

## RESULTS

**Table 1.** Mean pharmacokinetic parameters in plasma after a single dose of AFB1 and OTA with and without co-administration of a YCW preparation in rats

Parameters	Aflatoxin B1		Ochratoxin A	
	Control	YCW	Control	YCW
C <sub>max</sub> (ng/ml/kg BW)	0.72	0.27	28.78	20.84
T <sub>max</sub> (h)	4	5	5	5
t <sub>1/2</sub> (h)	63.6	65.4	63.6	65.4
AUC 0-∞(ng/ml/kg BW)	32.9	20.1	1758.5	1279.8
ΔAUC 0-∞(%)		38.9		27.2

YCW reduced the absorption of AFB1. Area under the curve extrapolated to infinity (AUC<sub>0-∞</sub>) and maximal concentration (C<sub>max</sub>) increased without change in the elimination half life (t<sub>1/2</sub>). In contrast, YCW had no effect on ochratoxin A absorption.

**Table 2.** Cumulative excretion of mycotoxins after a single dose of aflatoxin B1 and ochratoxin A with and without co-administration of a yeast cell wall preparation in rats

Experiment <sup>a</sup>		Urines <sup>b</sup>	Faeces <sup>b</sup>	Total excreted <sup>c</sup>
Aflatoxin B1 (0.716 µg/kg BW)	Control	6.1±2.0	39.0±3.4	45.1
	YCW	2.9±1.1 *	59.6±18.2 *	62.5
Ochratoxin A (3.22 µg/kg BW)	Control	5.6±1.3	16.3±2.6	44.1
	YCW	6.5±2.3	23.8±4.9 *	49.3

<sup>a</sup> Cumulative excretion (%), mean±SD, n=5) of radioactivity, <sup>b</sup> Excreted at 72 h, <sup>c</sup> Sum of urines and faeces at the end of the collection period that was 3 and 10 days for aflatoxin B1 and ochratoxin A, respectively

Co-administration of YCW and AFB1 increased, up to 55%, radioactivity excretion in faeces as compared to AFB1 alone, while the rate in urines decreased.

YCW effect on OTA was less marked. The radioactivity in faeces was increased up to 16% (P<0,05) but without modification of urinary excretion.

## CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

- These results indicate that YCW has the potential to protect animals against exposure to low dietary level of selected mycotoxins.
- Detoxification of aflatoxin B1 appears to be most efficient than for ochratoxin A.
- Evaluation of the protective action of YCW in ruminants is under way.

**Study carried out with the financial support of Institut National de la Recherche Agronomique and Alltech**

Aflatoxin B1 (AFB1) and Ochratoxin A (OTA) are mycotoxins that can be found in a large variety of feedstuffs. Consumption of contaminated feeds can affect the health and performances of farm animals and if transferred into animal products can be a problem for the safety of food. Different treatments of detoxication based on organic adsorbants addition have been developed to bind these mycotoxins in the digestive tract and thus to reduce exposure of animals. The objective of this work was to evaluate the efficacy of an adsorbent containing yeast cell wall extracts (Mycosorb®) in two animal models, the rat and the dairy ewe. The efficacy was determined by performing a monitoring of mycotoxins and/or their metabolites in 3 matrices: urinary and faecal excretion and blood kinetic. In both animal models, thus we have studied the effects of yeast cell walls on urinary and faecal excretion and blood kinetic of the 2 mycotoxins (AFB1 and OTA). Radioactivity analysis showed that faeces of animals supplemented with the adsorbent contained significantly more mycotoxins in rats. This increase of radioactivity in feces was associated with a marked decrease of radioactivity in blood and urine. In dairy ewes, in addition to these parameters, we have evaluated the effects of the adsorbent on the production parameters of animals and the excretion of mycotoxins in milk. The addition of yeast cell walls significantly increased the excretion of AFB1 and its metabolite, aflatoxin M1 (AFM1) in the faeces. This increase in fecal excretion was associated with a reduction of the excretion of AFM1 in urine but not in milk. The reduced absorption of AFB1 and OTA in both animal models could be associated with the capacity of the adsorbent to bind mycotoxins in the digestive tract. Addition of yeast cell wall extract could be a strategy to reduce sanitary risks in ruminants exposed to mycotoxins-contaminated feeds. However, we have not observed an effect on the health and the performances of animals in the experimental conditions used.

**Keywords : Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Rat, Dairy ewe, Toxicokinetic, Absorption, Excretion, Modified yeast cell walls extracts, Adsorbing agent, Detoxication**

L'aflatoxine B1 (AFB1) et l'ochratoxine A (OTA) sont des mycotoxines pouvant contaminer une large variété de denrées alimentaires. L'ingestion d'aliments contaminés par des animaux d'élevage peut entraîner l'altération de leur santé et de leurs performances zootechniques ainsi qu'un problème de sécurité alimentaire lié à la présence de résidus de mycotoxines dans les produits animaux, notamment le lait. Des traitements de détoxification basés sur l'addition d'adsorbants organiques ont été développés pour fixer les mycotoxines dans le tube digestif et ainsi réduire l'exposition des animaux. L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'efficacité d'un adsorbant à base d'extraits de parois modifiées de levures (Mycosorb®) sur deux modèles animaux, le rat et la brebis. L'efficacité a été déterminée en réalisant un suivi des mycotoxines et/ou de leurs métabolites dans 3 matrices: l'excrétion urinaire et fécale et la cinétique sanguine. Sur les 2 modèles animaux, nous avons ainsi étudié les effets de l'apport en Mycosorb sur l'excrétion urinaire et fécale et la cinétique sanguine des 2 mycotoxines (AFB1 et OTA). Chez le rat, le suivi de la radioactivité a montré que les fèces d'animaux supplémentés en parois de levures contiennent significativement plus de mycotoxines. Cette augmentation de la radioactivité dans les fèces s'est accompagnée d'une diminution marquée de la radioactivité dans le sang et dans les urines. Chez la brebis laitière, en plus de ces paramètres, nous avons évalué l'effet de l'adsorbant sur les paramètres de production de l'animal et l'excrétion des mycotoxines dans le lait. L'addition de la paroi de levure a entraîné une augmentation significative de l'excrétion de l'AFB1 et de son métabolite, l'aflatoxine M1 (AFM1) dans les fèces du ruminant. Cette augmentation de l'excrétion fécale s'accompagne de la réduction du taux d'AFM1 excrété dans l'urine mais pas dans le lait. Les effets observés chez les deux modèles expérimentaux semblent être liés à la séquestration des mycotoxines dans le tractus digestif des animaux et permettent de conclure à la capacité de l'adsorbant organique à réduire la biodisponibilité des mycotoxines testées. L'ajout de la paroi de levure pourrait, par conséquent, réduire les risques sanitaires chez les animaux d'élevage exposés à une alimentation contaminée par les mycotoxines. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet sur la santé et les paramètres zootechniques des animaux dans les conditions expérimentales utilisées.

**Mots-clés : Aflatoxine B1, Ochratoxine A, Rat, Brebis laitière, Toxicocinétique, Absorption, Excrétion, Extrait de parois modifié de levure, Agent adsorbant, Détoxification**