



Effets de trois fusariotoxines (beauvericine, enniatines et déoxynivalénol), seules ou en mélange, sur la santé et les performances des porcelets

Philippe PINTON (1), Barbara NOVAK (2), Amanda LOPES HASUDA (1, 3), Emilien JAMIN (2), Mahdi GHANBARI (2), Viviane Mayumi MARUO (1, 4), Manon NEVES (1), Caroline EMSENHUBER (2), Silvia WEIN (2), Justin OULES (1), Jean-François MARTIN (1), Ana Paula F.R.L. BRACARENSE (3), Isabelle P. OSWALD (1), Dian SCHATZMAYR (2).

(1) Toxalim-Centre de recherches en toxicologie alimentaire, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, 31027 Toulouse, France

(2) DSM - Centre de recherches BIOMIN, Technopark 1, 3430 Tulln, Autriche

(3) Laboratoire de pathologie animale, Université de Londrina, P.O. Box 10.011, Londrina, PR 86057-970, Brésil

(4) Université Fédérale du Tocantins, Araguaína 77824-838, Brésil

philippe.pinton@inrae.fr

Effets de trois fusariotoxines (beauvericine, enniatines et déoxynivalénol), seules ou en mélange, sur la santé et les performances des porcelets

Les climats tempérés européens favorisent la contamination des céréales par les champignons du genre *Fusarium* qui produisent, outre des mycotoxines réglementées comme le déoxynivalénol (DON), des mycotoxines dites émergentes car moins bien caractérisées. Certaines, comme la beauvericine et les enniatines B et B1 sont détectées en mélange avec le DON dans près de 90 % des aliments pour porcs. Les effets d'une exposition de 14 jours à la beauvericine et aux enniatines, seules ou en mélange avec le DON ont été étudiés chez des porcelets sevrés âgés d'un mois. Les animaux ont été répartis en quatre groupes : contrôle, DON, beauvericine + enniatines (EB) et DON + beauvericine + enniatines (EB+DON). Comparé au régime contrôle, le mélange EB+DON a diminué significativement la prise de poids des animaux et réduit les activités d'enzymes hépatiques mesurées dans le plasma. Tous les régimes contaminés par les mycotoxines ont provoqué des lésions histologiques modérées à sévères dans le jéjunum, le colon et le foie. Dans le plasma et le foie des animaux des groupes EB, plusieurs dizaines de métabolites discriminants ont été identifiés (acides aminés, lipides, acides biliaires, sucres, ou flavonoïdes) suggérant un effet sur le métabolisme des aliments. Chez les animaux exposés au régime EB, la diversité du microbiome intestinal a diminué et certains genres fongiques, viraux et bactériens ont été modifiés. Nos résultats contribuent à mieux connaître les effets de ces mycotoxines émergentes et montrent que, seules ou en mélange avec le DON, elles peuvent affecter les performances, l'intégrité de certains tissus et la santé intestinale des porcs.

Effects of three fusariotoxins (beauvericin, enniatins and deoxynivalenol), alone or in combination, on piglet health and performances

Temperate European climates favour the contamination of cereals by fungi of the genus *Fusarium*, which produce, in addition to regulated mycotoxins such as deoxynivalenol (DON), other mycotoxins such as beauvericin and enniatins B and B1, which are considered "emerging" because they are less well known. The latter are detected along with DON in nearly 90% of pig feed. Effects of 14-day exposure to beauvericin and enniatins, alone or in combination with DON were studied in one-month-old weanling piglets. Animals were divided into four groups: control, DON, beauvericin + enniatins (EB) and DON + beauvericin + enniatins (EB+DON). Compared to the control diet, the EB+DON diet significantly decreased piglet weight gain and liver enzyme activities measured in plasma. All mycotoxin-contaminated diets induced moderate-to-severe histological lesions in the jejunum, the colon, and the liver. In the plasma and liver of EB groups, several dozen discriminating metabolites were identified (amino acids, lipids, bile acids, sugars, or flavonoids) suggesting an effect on food metabolism. In animals fed with the EB diet, the diversity of the gut microbiome decreased, and certain fungal, viral, and bacterial genera changed. Our results improve knowledge of the effects of emerging mycotoxins and show that, alone or in combination with DON, they can influence performances, the integrity of certain tissues and pig intestinal health.

INTRODUCTION

Certaines espèces de moisissures comme les *Fusarium* produisent des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines. Parmi elles, certaines comme les enniatines (ENNs) et la beauvericine (BEA) sont dénommées émergentes car identifiées relativement récemment, peu étudiées et pas systématiquement détectées. Ces composés ionophores et lipophiles peuvent être à la fois cytotoxiques, promoteurs de stress oxydatif, pro-inflammatoires et génotoxiques, et possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et insecticides (Olleik *et al.*, 2019). Les ENNs et la BEA sont très présentes dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires. Elles contaminent jusqu'à 80 % des échantillons d'aliments pour animaux analysés récemment y compris ceux destinés aux porcs (Novak *et al.*, 2021). Les concentrations d'ENNs et de BEA varient de quelques microgrammes à quelques milligrammes par kg, selon le type d'aliment et les régions du monde concernées (EFSA, 2014). Par ailleurs, elles sont fréquemment rencontrées simultanément avec d'autres fusariotoxines comme le déoxynivaléol (DON) dont les effets délétères sur la santé digestive, les performances et le système immunitaire des porcs sont caractérisés (Payros *et al.*, 2016).

L'Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) a publié un avis scientifique sur le risque posé par les ENNs et la BEA, mais il n'y a aucune réglementation à ce jour, principalement à cause du manque de données issues d'expériences *in vivo* (EFSA, 2014).

L'objectif de cette étude était d'étudier les effets à court terme des mycotoxines émergentes ENNs et BEA seules, et en mélange avec la mycotoxine réglementée, DON, sur les performances, des marqueurs sanguins, le métabolome plasmatique et l'histomorphologie de l'intestin et du foie.

Enfin, comme les ENNs et BEA ont des propriétés antibiotiques, leur impact sur le microbiome fécal a été évalué.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des porcelets aux différents régimes - prélèvements d'échantillons

L'essai a été approuvé par le bureau du gouvernement de la région de Basse-Autriche (N°LF1-TVG-57/015-2019) et réalisé au Centre de nutrition animale appliquée (BIOMIN Holding GmbH, Tulln, Autriche). Trente-deux porcelets âgés d'un mois ($7,3 \pm 0,7$ kg) ont été répartis par paire dans des cages métaboliques, avec un accès libre à l'eau. Ils ont été nourris *ad libitum* deux fois par jour, pendant 14 jours avec un aliment contrôle (contrôle), contaminé par le DON, contaminé par ENNs et BEA (EB) ou co-contaminé par ENNs, BEA et DON (EB+DON). Les toxines, préparées à partir de céréales inoculées avec des souches de *Fusarium* productrices de toxines comme déjà décrit (Novak *et al.*, 2021), ont été incorporées aux aliments. Les concentrations en mycotoxines sont précisées dans le tableau 1.

Les animaux ont été pesés à J0 et J14, et la consommation d'aliment mesurée à la fin de l'essai.

Tableau 1 - Concentration en mycotoxines des différents régimes, µg/kg

| Toxines Régime | BEA | ENN B + B1 ¹ | DON ¹ | ZEN ¹ | FB1 ¹ |
|-------------------|------|-------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Contrôle | 4 | 161 | 92 | <LOQ ² | <LOQ ² |
| DON | 5 | 186 | 2524 | 342 | <LOQ ² |
| EB | 2570 | 1345 | 93 | <LOQ ² | <LOQ ² |
| EB+DON | 3578 | 1830 | 2034 | 263 | <LOQ ² |

¹ENN B + B1 = enniatines (B et B1), ZEN = zéaralénone, FB1 = fumonisine B1, DON = déoxynivaléol, EB = enniatines et beauvericine, ²LOQ = limite de quantification

1.2. Prélèvements

Du sang a été prélevé à J0, J7 et J14. Après centrifugation, le plasma a été congelé. A J14, les animaux ont été anesthésiés à la kétamine puis euthanasiés au T61. Des échantillons de tissus ont ensuite été prélevés pour une évaluation histomorphologique (jéjunum, colon, foie) et l'analyse du métabolome (foie). Des fèces ont été prélevées pour l'analyse du microbiome.

1.3. Dosage de marqueurs biochimiques du plasma et de santé intestinale

Un bilan biochimique des échantillons de plasma a permis de doser des enzymes indicatrices de lésions hépatiques dont la phosphatase alcaline (ALP), l'alanine aminotransférase (ALT), et l'aspartate aminotransférase (AST) ainsi que des marqueurs de la fonction rénale, lipidiques et du métabolisme. Trois marqueurs de santé intestinale ont été dosés par ELISA : facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1 (IGF-1) et protéine intestinale de liaison aux acides gras (i-FABP) (R&D Systems, Minneapolis, États-Unis) ainsi que la zonulin (ZON) (MyBioSource, San Diego, États-Unis).

1.4. Analyse histomorphologique

Pour cette analyse, les échantillons de jéjunum, de colon et de foie ont été traités et colorés à l'hématoxyline - éosine comme décrit précédemment (Bracarense *et al.*, 2012; Terziolo *et al.*, 2019). Le score lésionnel prend en compte le facteur de sévérité et l'étendue de chaque lésion et possède une valeur maximale de 39 et 33 pour l'intestin et le foie respectivement. Les cellules calciformes ont été colorées au bleu alcian et comptées de manière aléatoire sur dix champs par lame.

1.5. Analyse du métabolome plasmatique et hépatique

Les échantillons de plasma et de foie à J14 ont été analysés par chromatographie liquide en phase inverse associée à une spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS) (Jacques *et al.*, 2021). Les analyses ont été réalisées par ionisation négative et positive par électrospray. Les pics ont été sélectionnés et alignés grâce au programme XCMS, accessible sur le portail collaboratif workflow4metabolomics. Des analyses statistiques multivariées ont permis de mettre en évidence des métabolites discriminants qui ont été annotés et identifiés à l'aide de bases de données locales de temps de rétention, de spectres de masse à haute résolution et de spectres MS/MS.

1.6. Analyse métagénomique du microbiome fécal

L'ADN des échantillons fécaux individuels a été extrait à l'aide du kit QIAamp PowerFecal (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK).

Six cents ng d'ADN génomique ont été cisailés à l'aide de tubes g de Covaris en fragments de taille > 7-8 kb (Covaris, Inc., Woburn, Ma, États-Unis) et utilisés pour générer la bibliothèque d'ADN. Après ligation des adaptateurs, la bibliothèque a été séquencée de façon à obtenir 11 653 936 lectures 1D avec un score de qualité supérieur à 8. Les profils taxonomiques et l'estimation de l'abondance relative des taxons ont été générés à l'aide du système de classification Bracken (réestimation bayésienne de l'abondance après classification par méthode KrakEN) (Lu *et al.*, 2017). Les paquets R phyloseq (v. 1.30.0) ont été utilisés pour le traitement des données.

1.7. Analyses statistiques

Les données de performance et d'indice de consommation ont été évaluées dans le logiciel R-3.5. Les modèles à effets mixtes et les moindres carrés généralisés avec comparaisons multiples ultérieures ont été utilisés comme indiqué pour tester les différences entre les groupes. Les analyses statistiques des marqueurs biochimiques et des scores histologiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.0.2 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne). Elles ont été soumises à une analyse statistique, en utilisant les tests de normalité (Shapiro-Wilk) et d'homogénéité (Bartlett). Les différences significatives ont été évaluées par une ANOVA puis test de Tukey (données paramétriques) et par le test de Kruskal-Wallis puis test de Dunn (données non paramétriques).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Performances de croissance

À l'issue des 14 jours de l'étude, comparé au groupe contrôle, le gain de poids était significativement plus faible dans le groupe EB+DON ($2,64 \pm 0,20$ kg versus $1,99 \pm 0,21$ kg ; $P = 0,039$), avait tendance à être plus faible dans le groupe DON ($2,03 \pm 0,23$ kg ; $P = 0,062$) et était resté stable dans le groupe EB ($2,68 \pm 0,12$ kg). Les animaux exposés au DON seul ont significativement consommé moins d'aliment que ceux du groupe contrôle ($6\ 763 \pm 202$ g versus $7\ 839 \pm 68$ g ; $P = 0,001$). Dans le groupe EB+DON, une légère diminution de la consommation alimentaire a également été observée ($6\ 943 \pm 416$ g, $P = 0,076$).

À notre connaissance, cette étude est la première à étudier les effets d'un régime alimentaire contaminé par les mycotoxines émergentes ENN B, B1 et BEA chez les porcelets. L'exacerbation de la diminution du gain de poids chez les animaux du groupe EB+DON par rapport à ceux du groupe EB pourrait être liée aux propriétés ionophores des EB (EFSA, 2014) qui augmenteraient l'absorption intestinale du DON. Les deux groupes d'animaux exposés au DON ont consommé moins d'aliment que le groupe contrôle, confirmant des études précédentes. L'hypothèse avancée est qu'il s'agit d'une conséquence de l'impact du DON sur les hormones de satiété (EFSA, 2017).

2.2. Marqueurs biochimiques du plasma et de santé intestinale

À J7, la concentration d'albumine a augmenté significativement chez les porcelets des groupes EB par rapport au groupe contrôle (Tableau 2). Cette augmentation pourrait être due à l'effet ionophore des ENN et BEA sur les membranes cellulaires conduisant à une perturbation osmotique. Par ailleurs, les

protéines totales étaient plus élevées dans le groupe EB que dans le groupe contrôle. En revanche, l'absence d'augmentation de la concentration en protéines totales dans le groupe EB+DON pourrait être liée à l'effet inhibiteur bien caractérisé du DON sur la synthèse des protéines (Payros *et al.*, 2016). À J7, le calcium plasmatique était légèrement mais significativement plus élevé chez les porcelets du groupe EB+DON que dans le groupe contrôle. L'absence d'augmentation du calcium dans le groupe EB pourrait être due au fait que BEA augmente la concentration de calcium cytoplasmique, réduisant ainsi la quantité de calcium circulant (EFSA, 2014). Ces effets semblent être temporaires car aucune différence entre les groupes n'a été observée à J14.

À J14, les enzymes ALP, ALT et AST ont diminué de 21 à 30 % dans le groupe EB+DON par rapport au groupe contrôle (Tableau 2). À J14, la concentration en ALP a diminué dans les groupes recevant du DON. Une corrélation positive entre la consommation alimentaire et l'ALP sérique a déjà été rapportée. Aussi, la diminution de la consommation d'aliment pourrait expliquer la réduction d'ALP sérique observée. Elle pourrait être aussi due à une carence en zinc provoquée par une absorption inadéquate et corrélée avec une faible concentration d'ALP (Cho *et al.*, 2007). L'ALP participe au métabolisme de la vitamine B6, cofacteur de l'ALT et de l'AST (Ono *et al.*, 1995). De façon remarquable, dans les groupes d'animaux DON et EB+DON dans lesquels une réduction d'ALP a été observée, une réduction des concentrations en ALT et AST a aussi été mise en évidence. Et bien qu'une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques soit associée à des lésions hépatiques (Giannini *et al.*, 2005), des réductions de leurs activités ont déjà été observées dans certaines maladies hépatiques chroniques (Ono *et al.*, 1995).

Les protéines i-FABP, ZON et IGF-1, considérées comme biomarqueurs potentiels de la santé intestinale ont été dosées (Tableau 3). La ZON, décrite comme un marqueur de perméabilité dans les maladies intestinales chroniques, n'a pas varié entre les groupes, contrairement à ce qui a déjà été décrit chez des porcelets exposés 28 jours au DON (Wang *et al.*, 2018). Bien que non significative, une tendance à la diminution de la protéine IGF-1, qui pourrait être associée à la réduction de la croissance comme précédemment décrit (Pestka, 2010), a été observée dans le groupe DON par rapport au groupe contrôle à J7 et J14. En revanche, la concentration en i-FABP, un autre biomarqueur de perméabilité intestinale, était réduite dans les groupes EB ($P = 0,028$) et EB+DON ($P = 0,032$) à J14 par rapport au contrôle ainsi que dans le groupe DON mais de façon non significative ($P = 0,059$) (Tableau 3). L'i-FABP est généralement retrouvée dans le sang à partir de muqueuses endommagées (Funaoka *et al.*, 2010). L'inhibition de la synthèse des protéines par les EB (Olleik *et al.*, 2019) pourrait expliquer la diminution observée de la concentration plasmatique d'i-FABP.

2.3. Analyse histomorphologique du jéjunum, du colon et du foie

Le jéjunum des animaux du groupe contrôle présentait des villosités bien délimitées, bordées d'entérocytes colonnaires (Figure 1A) alors que celles du groupe DON étaient atrophiées avec un aplatissement et une vacuolisation du cytoplasme des entérocytes (Figure 1B). Cette vacuolisation était fréquemment observée chez les animaux du groupe EB (Figure 1C) et ceux du groupe EB+DON qui en plus, présentaient une atrophie des villosités (Figure 1D). Chez les animaux du groupe EB+DON, la dilatation des vaisseaux lymphatiques et un œdème interstitiel

de faible intensité ont été observés. Le nombre de cellules calciformes dans le jéjunum était significativement diminué chez les animaux du groupe DON ($P = 0,029$, Tableau 4) alors que la hauteur des villosités était plus faible chez les animaux

des groupes DON ($P = 0,008$) et EB+DON ($P = 0,022$) (Tableau 4). Globalement, le score lésionnel dans le jéjunum a augmenté significativement ($P = 0,007$) chez les animaux du groupe EB+DON par rapport au groupe contrôle (Tableau 4).

Tableau 2 - Analyses biochimiques du plasma à J7 (gauche) et J14 (droite)¹.

| Marqueurs analysés | Groupe d'animaux (jour de prélèvement et régime) | | | | Groupe d'animaux (jour de prélèvement et régime) | | | |
|---------------------------------------|--|------------------|-----------------|---------------|--|---------------|--------------|---------------|
| | J7 | | | | J14 | | | |
| | Contrôle | DON ² | EB ² | EB+DON | Contrôle | DON | EB | EB+DON |
| Phosphatase alcaline (ALP), U/L | 313,8 ± 91,5 | 231,2 ± 51,4 | 238,6 ± 68,5 | 236,5 ± 86,7 | 410,1 ± 91,5 | 293,6 ± 51,0* | 326,3 ± 94,8 | 288,6 ± 95,7* |
| Alanine aminotransférase (ALT), U/L | 32,6 ± 5,3 | 31,6 ± 4,3 | 31,4 ± 7,1 | 31 ± 6,8 | 57,8 ± 9,4 | 49,4 ± 8,35 | 45,6 ± 5,9* | 45,8 ± 9,4* |
| Aspartate aminotransférase (AST), U/L | 33,1 ± 8,5 | 34,8 ± 5,9 | 31,8 ± 7,6 | 28,3 ± 5,3 | 49,3 ± 7,4 | 46,8 ± 6,0 | 40,8 ± 6,0 | 38,6 ± 5,7* |
| Albumine, µmol/L | 404,6 ± 24,7 | 437,5 ± 38,2 | 445,1 ± 31,4* | 453,4 ± 26,9* | 430 ± 42,7 | 453,4 ± 18,0 | 443,2 ± 14,6 | 461,4 ± 28,2 |
| Protéines totales, g/L | 50,3 ± 3,9 | 52,2 ± 3,3 | 55,9 ± 3,0* | 52,5 ± 2,3 | 48,4 ± 3,6 | 48,9 ± 3,2 | 48,8 ± 2,3 | 48,6 ± 2,1 |
| Calcium, mmol/L | 2,30 ± 0,09 | 2,36 ± 0,05 | 2,39 ± 0,07 | 2,46 ± 0,12* | 2,64 ± 0,16 | 2,64 ± 0,11 | 2,59 ± 0,13 | 2,55 ± 0,13 |

¹ Les dosages de l'urée, glucose selon méthode PAP, cholestérol, lipoprotéines HDL et LDL, triglycérides, créatinine, acide urique et phosphore n'ont pas montré de différences significatives entre les groupes d'animaux à J7 ou à J14. ²DON = déoxynivalénol, EB = enniatines et beauvericine, * : $P < 0,05$.

Tableau 3 - Concentration en ZON et IGF-1, ng/ml et i-FABP, pg/ml¹.

| Marqueurs de santé intestinale | Groupe d'animaux (jour de prélèvement et régime) | | | | Groupe d'animaux (jour de prélèvement et régime) | | | |
|--------------------------------|--|------------------|-----------------|----------|--|----------|-----------|-----------|
| | J7 | | | | J14 | | | |
| | Contrôle | DON ² | EB ² | EB+DON | Contrôle | DON | EB | EB+DON |
| ZON | 217 ± 8 | 214 ± 12 | 216 ± 7 | 226 ± 10 | 364 ± 15 | 313 ± 16 | 342 ± 12 | 335 ± 18 |
| IGF-1 | 50 ± 4 | 43 ± 3 | 47 ± 5 | 40 ± 4 | 83 ± 5 | 69 ± 5 | 77 ± 8 | 64 ± 6 |
| i-FABP | 76 ± 36 | 40 ± 8 | 39 ± 14 | 19 ± 6 | 195 ± 78 | 56 ± 19 | 36 ± 10 * | 39 ± 10 * |

¹ ZON = zonulin, IGF-1 = facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1, i-FABP = protéine intestinale de liaison aux acides gras ; ²DON = déoxynivalénol, EB = enniatines et beauvericine, * : $P < 0,05$.

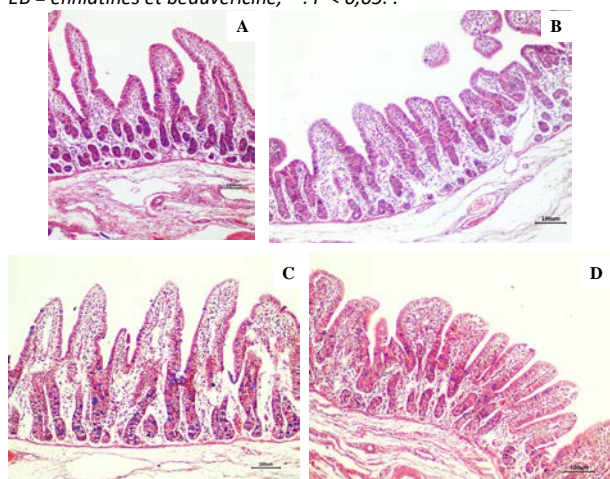


Figure 1 - Coupes histologiques de jéjunum des groupes contrôle (A), DON (B), EB (C) et EB+DON (D). Coloration hématoxyline-éosine. Barre d'échelle 100 µm

Une diminution significative du nombre de cellules calciformes dans le jéjunum a été observée chez les animaux du groupe DON alors que la hauteur des villosités a significativement diminué dans les groupes DON et EB+DON (Tableau 4).

Dans le côlon, aucune différence significative entre les groupes n'a été observée pour le score lésionnel. Les changements de structure du jéjunum observés dans le groupe DON sont en accord avec la littérature (Pinton et Oswald, 2014). La vacuolisation des entérocytes fréquemment observée chez les animaux des groupes EB pourrait être associée aux propriétés ionophores des ENN et de l'EB qui modifie la perméabilité des membranes cellulaires.

Dans le foie, le score lésionnel des animaux des groupes EB et EB+DON était significativement plus élevé que celui du groupe contrôle ($P = 0,043$ et $P = 0,011$, respectivement) (Tableau 4). Ils présentaient principalement une vacuolisation modérée à sévère des hépatocytes et une mégalocytose. L'apoptose et la nécrose focale d'hépatocytes ont également été observées dans les groupes DON et EB+DON (Figure 2B et 2D).

Les effets dans le foie des animaux du groupe EB sont apparus plus marqués que dans leur intestin, peut-être en raison de l'absorption rapide connue de ENN B1 et à son métabolisme rapide dans le foie (Devreese *et al.*, 2014). La vacuolisation modérée à sévère des hépatocytes et la mégalocytose observées chez les porcelets des groupes EB pourraient être dues à une bioaccumulation des ENN et BEA lipophiles dans les tissus riches en graisses, comme cela a été observé chez la souris (Rodríguez-Carrasco *et al.*, 2016).

Tableau 4 - Score lésionnel, nombre de cellules caliciformes par champ et hauteur des villosités du jéjunum, score lésionnel du foie. n = 8.

| | | Contrôle | DON ¹ | EB ¹ | EB+DON ¹ |
|---------|-------------------------------|-----------|------------------|-----------------|---------------------|
| Jéjunum | Score lésionnel | 3,3 ± 0,5 | 6,9 ± 1,7 | 5,4 ± 0,8 | 7,4 ± 1,8 * |
| | Cellules caliciformes, nombre | 17 ± 1 | 10 ± 1* | 13 ± 2 | 14 ± 2 |
| | Hauteur des villosités, µm | 353 ± 11 | 275 ± 23* | 300 ± 3 | 284 ± 14* |
| Foie | Score lésionnel | 3,0 ± 0,4 | 5,9 ± 0,9 | 6,3 ± 0,9* | 6,9 ± 1,0* |

¹ DON, EB et EB+DON = aliments contaminés respectivement par le DON, les enniatines et la beauvéricine et les enniatines, la beauvéricine et le DON ; * : P < 0,05

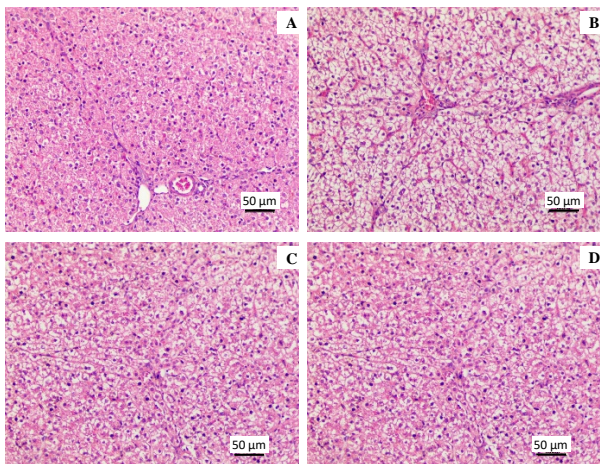


Figure 2 - Coupes histologiques de foie des groupes contrôle (A), DON (B), EB (C) et EB+DON (D). Coloration hématoxyline-éosine. Barre d'échelle 50 µm

2.4. Analyse métagénomique du microbiome fécal

L'exposition aux mycotoxines a eu un impact sur la diversité et la structure du microbiote fécal des porcelets. Au total, 1 945 espèces microbiennes différentes ont été observées parmi lesquelles les Firmicutes, les Ascomycètes et les Protéobactéries étaient les membres les plus abondants. Dans le groupe EB, le phylum Actinobactéries était le plus abondant, allant de pair avec une réduction des Ascomycètes (Figure 3A). Pour ce qui concerne les espèces les plus abondantes, *Aureobasidium namibiae* a complètement disparu dans les groupes EB et EB+DON, tandis que *Mycobacterium branderi* a été trouvé en quantité remarquable dans le groupe EB, mais pas dans les autres groupes (Figure 3B). L'analyse statistique des résultats a montré que 14 % de la variation des profils du microbiote fécal des porcelets s'expliquait par leur groupe d'appartenance. Les différences les plus importantes dans l'abondance relative des taxons avec le groupe contrôle étaient respectivement celles des groupes EB, DON et EB+DON.

L'activité antibiotique des ENNs et BEA contre principalement des bactéries gram-positives et champignons a déjà été décrite et attribuée à leurs propriétés ionophores (Olleik *et al.*, 2019). Elle pourrait expliquer les différences dans le microbiome fécal entre les groupes d'animaux. La diversité plus faible du

microbiome fécal des animaux du groupe EB par rapport au EB+DON pourrait s'expliquer par un effet antagoniste du DON. En effet, il a été montré que le DON peut changer l'équilibre de la microflore et modifier l'indice de richesse chez le porc sans influencer la diversité (Wache *et al.*, 2009).

2.5. Analyse du métabolome plasmatique et hépatique

Les métabolites circulants du plasma et du foie des animaux des groupes contrôle et EB ont été analysés à la fin de l'essai. Environ 60 métabolites discriminants ont été identifiés à partir du plasma et 28 pour le foie (Figure 4). Dans ces deux matrices, ils correspondent principalement à des acides aminés, des lipides, des acides biliaires, des sucres, des purines, des vitamines et à de nombreux métabolites flavonoïdes. Ces résultats suggèrent un effet des ENNs et BEA sur le métabolisme des aliments. A notre connaissance, il s'agit de la première démonstration de l'effet de l'exposition aux ENN et BEA sur le métabolome de plasma et du foie chez le porc.

CONCLUSION

Nous avons observé que le régime EB+DON réduit de manière significative la prise de poids en 14 jours, ce qui n'a pas été observé dans les groupes EB ou DON. Chez tous les animaux exposés à un régime contaminé, des changements histologiques modérés à sévères dans l'intestin et le foie ont été observés, bien que cela n'ait pas clairement modifié les biomarqueurs plasmatiques. Les mycotoxines ENNs et BEA ont eu un effet sur des métabolites impliqués dans le métabolisme des aliments ainsi que sur la diversité du microbiome intestinal alors que ces effets n'étaient pas aussi évidents lorsque le DON était également inclus dans l'alimentation. Compte tenu de la forte prévalence des ENNs et BEA et de leur co-occurrence, notamment avec le DON dans différents aliments pour animaux, il est important de produire davantage de données pour pouvoir évaluer les risques de façon convenable.

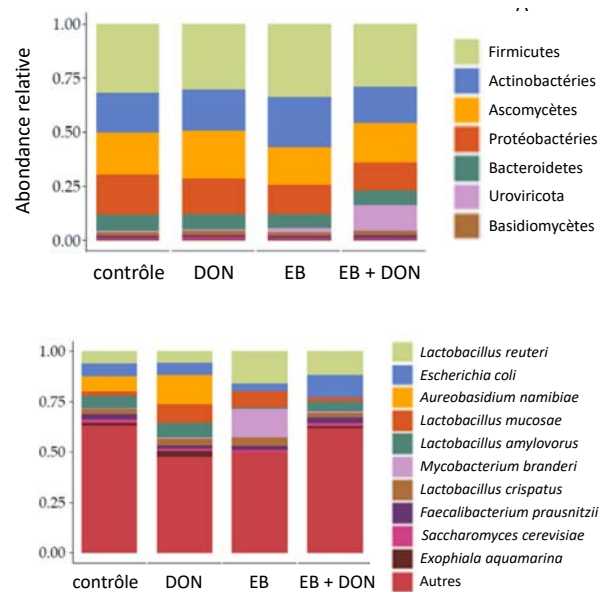


Figure 3 - Abondance relative des 10 phyla microbiens les plus abondants (A) et des espèces microbiennes (B) identifiés dans le microbiome fécal des porcelets

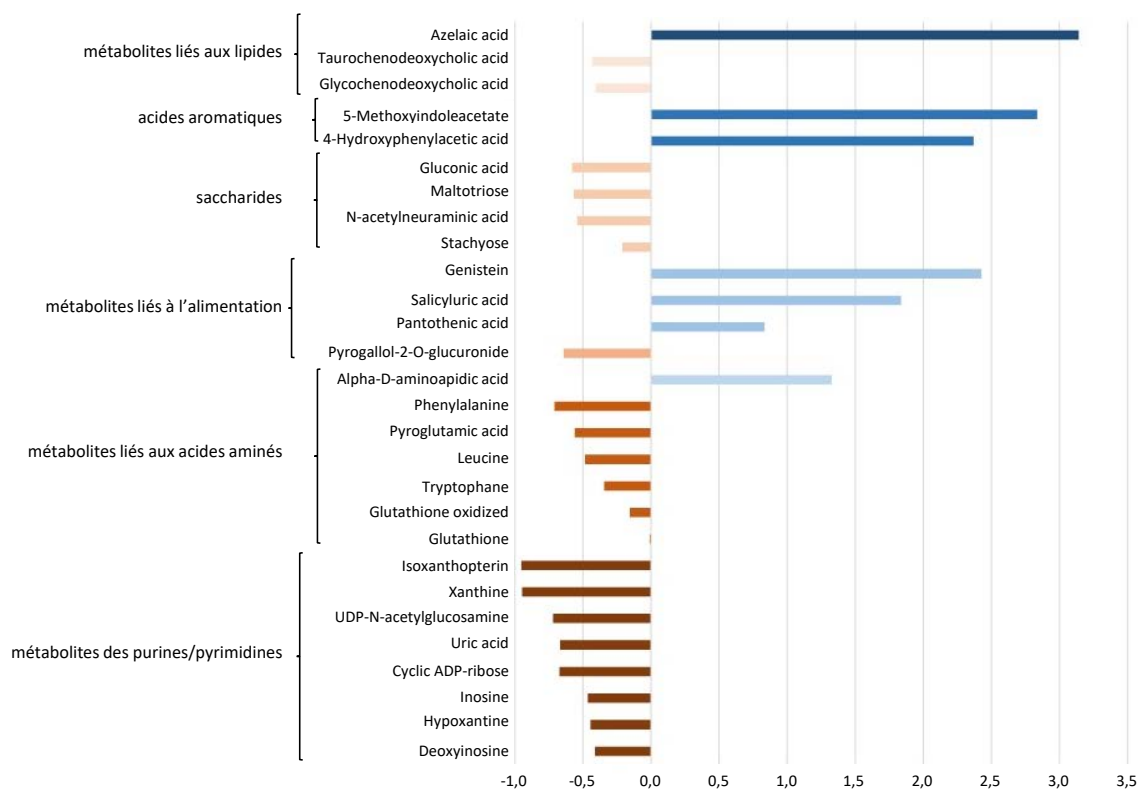


Figure 4 - Taux de variation (log2) des métabolites discriminants du foie entre les groupes contrôle et EB

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bracarense A.P., Lucoli J., Grenier B., Drociunas Pacheco G., Moll W.D., Schatzmayr G., Oswald I.P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Br J Nutr*, 107, 1776-1786.
- Cho Y.-E., Lomeda R.-A.R., Ryu S.-H., Sohn H.-Y., Shin H.-I., Beattie J.H., Kwun I.-S., 2007. Zinc deficiency negatively affects alkaline phosphatase and the concentration of Ca, Mg and P in rats. *Nutr Res Pract*, 1, 113-119.
- Devreese M., Broekaert N., De Mil T., Fraeyman S., De Backer P., Croubels S., 2014. Pilot toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of the Fusarium mycotoxin enniatin B1 in pigs. *Food Chem Toxicol*, 63, 161-165.
- EFSA, 2014. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA J*, 12, 3802.
- EFSA, 2017. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J*, 15, 4718.
- Funaoka H., Kanda T., Fujii H., 2010. [Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases]. *Rinsho Byori*, 58, 162-168.
- Giannini E.G., Testa R., Savarino V., 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, 172, 367-379.
- Jacques C., Jamin E.L., Jouanin I., Canlet C., Tremblay-Franco M., Martin J.F., Zalko D., Brunel Y., Bessou-Touya S., Debrauwer L., Ferret P.J., Duplan H., 2021. Safety assessment of cosmetics by read across applied to metabolomics data of in vitro skin and liver models. *Arch Toxicol*, 95, 3303-3322.
- Lu J., Thielen P., Salzberg S.L., 2017. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science* 3:e104.
- Novak B., Lopes Hasuda A., Ghanbari M., Mayumi Maruo V., Bracarense A.P.F.R.L., Neves M., Emsenhuber C., Wein S., Oswald I.P., Pinton P., Schatzmayr D., 2021. Effects of Fusarium metabolites beauvericin and enniatins alone or in mixture with deoxynivalenol on weaning piglets. *Food Chem Tox*, 158, 112719.
- Olleik H., Nicoletti C., Lafond M., Courvoisier-Dezord E., Xue P., Hijazi A., Baydoun E., Perrier J., Maresca M., 2019. Comparative Structure-Activity Analysis of the Antimicrobial Activity, Cytotoxicity, and Mechanism of Action of the Fungal Cyclohexadepsipeptides Enniatins and Beauvericin. *Toxins*, 11, 514.
- Ono K., Ono T., Matsumata T., 1995. The pathogenesis of decreased aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activity in the plasma of hemodialysis patients: the role of vitamin B6 deficiency. *Clin Nephrol*, 43, 405-408.
- Payros D., Alassane-Kpembi I., Pierron A., Loiseau N., Pinton P., Oswald I.P., 2016. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Arch Toxicol*, 90, 2931-2957.
- Pestka J.J., 2010. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 84, 663-679.
- Pinton P., Oswald I.P., 2014. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins*, 6, 1615-1643.
- Rodríguez-Carrasco Y., Heilos D., Richter L., Süßmuth R.D., Heffeter P., Sulyok M., Kenner L., Berger W., Dornetshuber-Fleiss R., 2016. Mouse tissue distribution and persistence of the food-born fusariotoxins Enniatin B and Beauvericin. *Toxicol. Letters*, 247, 35-44.
- Terciolo C., Bracarense A.P., Souto P., Cossalter A.M., Dopavogui L., Loiseau N., Oliveira C.A.F., Pinton P., Oswald I.P., 2019. Fumonisin at Doses below EU Regulatory Limits Induce Histological Alterations in Piglets. *Toxins*, 11, 548.
- Wache Y.J., Valat C., Postollec G., Bougeard S., Burel C., Oswald I.P., Fravallo P., 2009. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 1-17.
- Wang S., Yang J., Zhang B., Wu K., Yang A., Li C., Zhang J., Zhang C., Rajput S.A., Zhang N., Sun L., Qi D., 2018. Deoxynivalenol impairs porcine intestinal host defense peptide expression in weaned piglets and IPEC-J2 cells. *Toxins*, 10, 541.