

BIOMARQUEURS D'UNE EXPOSITION AUX FUMONISINES ET A LA ZEAREALÉNONE : CAS DU POULET ET LA DINDE DE CHAIR EXPOSÉS A DES ALIMENTS CONTAMINÉS A DES TENEURS INFÉRIEURES AUX MAXIMA RECOMMANDÉS

Guerre Philippe¹, Metayer Jean Paul², Mika Amandine³, Cleva Didier⁴, Boissieu Cyril⁴,
Le Bourhis Céleste⁵, Tardieu Didier¹, Travel Angélique³

¹Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France;

²ARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France;

³ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

⁴Chêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;

⁵INRA, Unité 1295 PEAT Centre Recherche Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France.

p.guerre@envt.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de l'étude est d'évaluer la sensibilité de biomarqueurs mesurés au niveau hépatique chez les volailles lors d'une exposition à des mycotoxines à des teneurs dans les aliments inférieures ou égales aux maxima recommandés en Europe. Dans un premier essai, des aliments « artificiellement » contaminés (20 mg FBs/kg et 0,5 mg ZEN/kg) ont été distribués à 14 poulets (J0 à J35) et à 14 dindes (J56 à J70). Dans un second essai, de l'aliment « naturellement » contaminé (7,5 mg FBs/kg et 0,6mg ZEN/kg) a été distribué à 15 poulets (J20 à J34) et à 15 dindes (J55 à J69). Pour chaque essai, de l'aliment indemne en mycotoxines a été distribué dans les mêmes conditions à des lots témoins. Le dosage de la sphinganine (Sa), sphingosine (So), Fumonisine B1 (FB1) et l'alpha-zéaralénol (α -ZEL) total a été réalisé dans le foie. La distribution de l'aliment contaminé à 20 mg FBs/kg a entraîné une élévation du rapport Sa/So hépatique par rapport aux animaux témoins, et ce dans les 2 espèces. Aucune différence entre groupes n'a en revanche été observée sur le rapport Sa/So avec l'aliment contenant 7,5 mg FBs/kg. Le dosage de la FB1 hépatique en UHPLC-MS/MS après purification sur colonne d'immuno-affinité a permis de révéler la présence de la toxine dans le foie de tous les animaux exposés, y compris ceux recevant l'aliment naturellement contaminé à 7,5 mg FBs/kg. Le dosage de l' α -ZEL total dans le foie a montré des teneurs supérieures à la LOQ (0.25 μ g α -ZEL /kg) chez les dindes et les poulets exposés, avec de fortes différences entre espèces. En conclusion, ces résultats montrent que les dosages hépatiques de l' α -ZEL total et de la FB1 peuvent être utilisés chez la volaille comme biomarqueurs respectifs d'exposition à la ZEN et aux FBs à des niveaux de contamination des aliments inférieurs aux maxima recommandés en Europe. Le dosage de la FB1 s'est par ailleurs révélé plus sensible que le rapport Sa/So, jusqu'à présent utilisé pour révéler l'exposition aux FBs.

ABSTRACT

Biomarkers in order to detecting fumonisins and zearalenone exposure: case of chicken and turkey exposed to contaminated feeds at levels below the maximum recommended levels

The objective of this study is to evaluate the liver biomarkers sensitivity in poultry when exposed to mycotoxins at feed levels less than or equal to the maximum recommended in Europe. In a first trial, "artificial" contaminated feed (20 mg FBs/kg and 0.5 mg ZON/kg) was distributed to 14 chickens (D0 to D35) and 14 turkeys (D56 to D70). In a second trial, "natural" contaminated feed (7.5 mg FBs/kg and 0.6mg ZEN/kg) was distributed to 15 chickens (D20 to D34) and 15 turkeys (D55 to D69). For each trial, mycotoxin-free feed was distributed under the same conditions to control groups. The determination of sphinganine (Sa), sphingosine (So), Fumonisin B1 (FB1) and total alpha-zearalenol (AZON) was performed in the liver. The distribution of contaminated feed at 20 mg FBs/kg resulted in an increased Sa/So liver ratio compared to control animals, in both species. However, no differences between groups were observed on the Sa/So liver ratio with the feed containing 7.5 mg FBs/kg. FB1 hepatic determination by UHPLC-MS/MS after purification with immuno-affinity column revealed the toxin presence in the liver of all exposed animals, including those receiving the naturally contaminated feed (7.5 mg FBs/kg). The total AZON determination in the liver showed levels above the quantification limit (0.25 μ g AZON/kg) in exposed turkeys and chickens, with significant species differences. In conclusion, total AZON and FB1 hepatic determinations can be used in poultry as respective biomarkers of exposure to ZON and FBs at feed contamination levels below the maximum recommended in Europe. The FB1 assay was also more sensitive than Sa/So ratio, which has so far been used to reveal exposure to FBs.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des composés toxiques produits par divers types de moisissures après contamination de cultures alimentaires, principalement des céréales.

La présence de mycotoxines dans les aliments pour animaux peut avoir des répercussions sur la santé animale. Les effets potentiels indésirables sur la santé des animaux, sont nombreux tels que des effets reprotoxiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, dermatotoxiques, immunomodulateurs, toxicité digestive et altération des performances (AFSSA, 2009). Ces effets dépendent du niveau d'exposition (dose, durée) mais surtout de la mycotoxine en cause, de ses métabolites et de leurs taux de transfert. Les volailles sont particulièrement exposées aux mycotoxines du fait de la part importante des céréales dans leur alimentation.

Compte tenu des propriétés des fusariotoxines, des altérations des capacités hépatiques de détoxications et des altérations du fonctionnement du système immunitaire susceptibles d'augmenter le risque d'infections secondaires et/ou de réduire l'efficacité vaccinale peuvent être envisagées. Ainsi, une augmentation de la pression sanitaire et un recours accru à l'usage d'anti-infectieux peut être redouté.

La faible spécificité des signes cliniques observés dans ces conditions rend difficile le diagnostic de mycotoxicose par les vétérinaires, et limite la mise en place d'actions correctives. La détection précoce et spécifique de cette exposition, via l'identification de biomarqueur, est un outil essentiel de diagnostic. En ce qui concerne les fusariotoxines, seuls des biomarqueurs spécifiques d'exposition aux fumonisines, à travers la détermination du rapport sphinganine/sphingosine, sont aujourd'hui disponibles (Tran et al., 2006b ; Tardieu et al., 2008b). Pour la zéaralénone (ZEN), un biomarqueur d'exposition spécifique pourrait être l'alpha-zéaralénol (α -ZEN), métabolite réduit de la zéaralénone doté de propriétés xéno-oestrogéniques très supérieures à la molécule mère (EFSA, 2017). Ce composé a été identifié dans toutes les espèces aviaires où il a été recherché lors d'études *in vitro* (Kolf-Clauw et al., 2008). Des études préliminaires réalisées chez la dinde exposée à 0,5 mg de zéaralénone/kg d'aliment confirment sa présence.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité de ces biomarqueurs mesurés dans le foie chez le poulet de chair et la dinde en réponse à une ingestion d'aliments contaminés « artificiellement » ou « naturellement » par des fumonisines et de la zéaralénone.

1. MATERIELS ET METHODES

Pour chaque essai, les performances zootechniques ont été enregistrées à chaque transition alimentaire et calculées pour l'ensemble de la période d'élevage.

1.1. Essai avec des aliments artificiellement contaminés en mycotoxines

1.1.1. Les aliments

Les mycotoxines nécessaires à l'expérimentation ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes tel que présenté dans l'article de Travel et al. (2017). Trois aliments expérimentaux (base maïs – soja) ont été constitués pour obtenir un lot témoin (sans ajout de mycotoxines de synthèse), un lot FBs (20 mg /kg du total FB1+FB2), un lot ZEN (0,5 mg/kg).

1.1.2. Les animaux

Quarante-deux poulets de chair (Ross PM3 mâles) ont été élevés en cages individuelles de 0 à 35 jours d'âge. Puis, chacun des 2 aliments expérimentaux contenant les mycotoxines (lot FBs et ZEN) et l'aliment témoin (T) a été distribué individuellement à 14 poulets de chair 0 à 35 jours d'âge. Les caractéristiques nutritionnelles étaient les suivantes : protéines = 22 % et EM = 2880 kcal/kg de 0 à 10 jours, puis protéines = 19,5 % et EM = 3050 kcal/kg de 11 à 35 jours. A J35, 14 poulets par lot ont été sacrifiés.

En parallèle, 42 dindes de chair (Grade Maker mâles) ont été élevées en cages individuelles de 0 à 55 jours d'âge avec un aliment démarrage (J0-J27) puis un aliment croissance 1 (J28-J55) suivant les recommandations habituelles et indemnes de mycotoxines (< 80 μ g de DON, < 20 μ g de FBs, < 50 μ g de ZEN /kg). Puis, chacun des 2 aliments expérimentaux contenant les mycotoxines (lot FBs et ZEN) et l'aliment témoin (protéines = 21 % et EM = 3125 kcal/kg) a été distribué individuellement à 14 dindes de 56 à 70 jours d'âge. A J70, 14 dindes par lot ont été sacrifiées.

1.2. Essai avec des aliments naturellement contaminés en mycotoxines

1.2.1. Les aliments

Des matières premières naturellement contaminées par des mycotoxines (blé et maïs – cf Travel et al., 2019) ont permis de formuler des aliments pour volailles représentatifs de la situation « la plus critique », susceptible d'être rencontrée sur le terrain sur la période 2012-2014 et qui répondent aux recommandations de l'UE. Les analyses (LC-MS/MS) ont confirmé les profils suivants pour l'aliment poulet : 7,3 mg FBs/kg (6,0 FB1 et 1,3 FB2) et 0,6 mg ZEN/kg et pour l'aliment dinde : 7,9 mg FBs/kg (6,5 FB1 et 1,4 FB2) et 0,6 mg ZEN/kg.

1.2.2. Les animaux

Trente poulets de chair (Cobb 500 mâles) ont été élevés au sol, en 2 groupes de 15 animaux. De 0 à 34 jours d'âge, les poulets ont tous reçu 2 phases alimentaires classiques (démarrage et croissance). Jusqu'à J20, les 2 groupes ont reçu un aliment sans mycotoxines, puis pendant 14j (J20-J34), le groupe M a reçu l'aliment « naturellement » contaminé en mycotoxines alors que le groupe T continuait à

recevoir un aliment indemne de mycotoxines. A J34, 10 poulets des lots T et M ont été sacrifiés.

Trente dindes de chair (Grade Maker mâles) ont été élevées au sol, en 2 groupes de 15 animaux. De 0 à 69 jours d'âge, les dindes ont toutes reçu 3 phases alimentaires classiques (démarrage, croissance 1, croissance 2). Jusqu'à J55, les 2 groupes ont reçu un aliment sans mycotoxines, puis pendant 14j (J55-J69), le groupe M a reçu l'aliment « naturellement » contaminé en mycotoxines alors que le groupe T continuait à recevoir un aliment indemne de mycotoxines. A J69, 10 dindes des lots T et M ont été sacrifiées.

1.3. Prélèvements, recherche des biomarqueurs

A la fin de l'exposition, après 8h de jeûne, les animaux ont été mis à mort par élongation des cervicales puis exsanguination. Sur chaque animal, le foie a été prélevé et conservé à -20°C pour dosage des concentrations en sphingolipides et mycotoxines.

1.3.1. Sphingolipides

Cinq cent milligrammes de foie sont broyés au potter dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7.2). Un volume fixe de C20 Sphinganine équivalent à 0,2 nmol est ajouté aux échantillons. Les lipides sont extraits par du chloroforme alcalin et une hydrolyse alcaline est réalisée comme précédemment décrit (Tran et al., 2006a). Les extraits chloroformiques sont séchés et repris dans 20µl de méthanol et positionnés dans un préparateur d'échantillon. Une dérivation à l'aide d'OPA est réalisée 10 minutes avant injection dans le système HPLC.

La séparation et le dosage des sphingolipides est réalisée sur colonne C18 Radial-Pak (Waters associated, Inc., Milford, MA), comme précédemment décrit (Tran et al., 2003). Les teneurs tissulaires en Sa et So sont exprimées après correction du rendement de la méthode d'analyse mesuré pour chaque échantillon à l'aide de la C20 Sa.

1.3.2. Fumonisine B1

Un gramme d'homogénat est broyé au potter dans du tampon NaCl. Un volume fixe de U-[13C34]-FB1 (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) est ajouté aux échantillons (12,5µl d'une solution à 1µg/ml dans l'acétonitrile/eau, v/v). Les FBs sont extraites par un mélange acétonitrile/eau puis purifiées sur colonnes FUMONIPREP (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) selon les recommandations du fabricant et comme précédemment décrit (Tardieu et al., 2008a). L'éluat de filtration est séché et repris dans 200µl de méthanol/eau, 10µl sont injectés dans le système HPLC.

La séparation de la FB1 est réalisée sur colonne C18 Poroshell 120 (Agilent) à l'aide d'un gradient méthanol/eau contenant 0,1% d'acide formique. Le dosage est réalisé en ESI (Agilent G6410B), avec deux ions qualifiants pour chaque toxine.

Les teneurs tissulaires en FB1 sont exprimées après correction du rendement de la méthode d'analyse mesuré pour chaque échantillon à l'aide de 13CFB1.

1.3.3. Alpha-zéaralénol

Cinq grammes d'homogénats sont broyés au potter dans du tampon acétate (0,2M, pH7,2). Un volume fixe de U-[13C18]-ZEN (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) est ajouté (12,5µl d'une solution à 1µg/ml dans l'acétonitrile/eau, v/v). L'homogénat est extrait en présence d'acétonitrile (1V/4V), évaporé à sec, et repris dans du tampon acétate (0,2M, pH5). L'extrait est incubé une nuit à 37°C en présence de bêta-glucuronidase (Helix pomatia SIGMA, >1700 U/g) comme précédemment décrit (Kolf-Clauw et al., 2007). L'incubat est extrait en présence d'acétonitrile (1V/4V) et évaporé à sec. L'extrait sec est repris dans du tampon acétate (0,2M, pH7,2) et purifié sur colonne Easi-extract zearalenone (RBiopharm, Darmstadt, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. L'éluat de filtration est séché et repris dans 200µl de méthanol/eau, 10µl sont injectés dans le système HPLC.

La séparation de l'α-ZEL est réalisée sur colonne C18 Poroshell 120 (Agilent) à l'aide d'un gradient méthanol/eau contenant 0,1% d'acide formique. Le dosage est réalisé en ESI (Agilent G6410B). Les teneurs tissulaires sont exprimées après correction des rendements de la méthode d'analyse mesurés à l'aide de ¹³C ZEN.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Aucune mortalité, aucune perte de performance, ni aucun signe lésionnel n'ont été observés dans ces essais. Pour chaque essai, les analyses de mycotoxines ont été effectuées sur 6 animaux par lot pris au hasard, soit 24 échantillons au total.

2.1. Sphingolipides

Les concentrations en Sa et So mesurées dans les foies des dindes et poulets au cours de ces deux essais ont permis la détermination du rapport Sa/So (Figure 1). Une différence significative entre animaux témoins et animaux exposés est observée chez la dinde et le poulet recevant un aliment contaminé à hauteur de 20 mg FB1+FB2/kg (Figure 1A). L'effet est plus marqué chez la dinde (multiplication du rapport Sa/So par un facteur 2,6) que chez le poulet (multiplication par un facteur 1,5). En revanche, aucune différence significative entre groupes n'est observée lorsque l'aliment contaminé contenait 7.5 mg FB1+FB2/kg (Figure 1B). Ces résultats sont en accord avec la plupart des données de la littérature qui indiquent qu'un effet des fumonisines sur le rapport Sa/So est observé pour des doses de 5 à 20 mg FB1+FB2/kg d'aliment, selon l'espèce et la durée d'exposition (Tran et al., 2016a et b, Magnin et al., 2017).

2.2. Fumonisine B1

Les concentrations hépatiques en FB1 mesurées chez les dindes et poulets en fin d'étude après un jeûne de 8h sont présentées dans la figure 2. Dans les deux essais les teneurs en FB1 étaient supérieures à la LOQ chez les animaux exposés. Cinq échantillons sur 24

étaient compris entre 0,5 et 1 µg FB1/kg chez les animaux (1 poulet et 4 dindes) non exposés. La fréquence de leur répartition entre animaux et essais (aliments artificiellement ou naturellement contaminé) était aléatoire. La présence de FB1 dans le foie d'animaux exposés à des teneurs de 20 mg FB1+FB2/kg est en accord avec les données précédemment publiées chez la volaille (Tardieu et al., 2008b et 2009). Aucune différence entre dindes et poulets n'est observée dans cette étude, et ce malgré la différence de durée d'exposition à la dose de 20 mg FB1+FB2/kg. Ce dernier résultat suggère que la FB1 ne s'accumule pas dans le foie des animaux. Il est en accord avec les données de toxicocinétique plasmatique qui révèlent un temps de demi-vie plasmatique court, variant de 20 à 106 min chez la dinde et le poulet (Tardieu et al., 2008b ; Antonissen et al., 2015). La comparaison des niveaux de FB1 hépatique entre les deux études suggère par ailleurs que le taux de transfert/persistance hépatique de la FB1 n'est pas linéaire.

La mise en évidence de FB1 dans les foies d'animaux exposés à un aliment contenant 7,5 mg FB1+FB2/kg montre que ce dosage peut être utilisé comme biomarqueur d'exposition chez la volaille et à des niveaux de contamination des aliments très inférieures aux maxima recommandés dans l'UE pour ces espèces. Il est par ailleurs important de noter que cette exposition peut être révélée en l'absence d'effet sur le rapport Sa/So (Figure 1), biomarqueur alors considéré comme le plus sensible lors d'exposition aux FBs dans la totalité des espèces animales où il a été recherché et chez l'homme (Shephard et al., 2007).

2.3. Alpha-zéaralénol

La figure 3 présente les concentrations hépatiques en α -ZEL total mesurées chez les dindes et poulets en fin d'étude, après 8h de jeûne. Les teneurs en α -ZEL étaient supérieures à la LOQ chez tous animaux exposés. Neuf échantillons sur 24 étaient compris entre 0,25 et 1 µg α -ZEL/kg chez les animaux non exposés. Sept étaient chez la dinde, deux chez le

poulet. Les teneurs en α -ZEL hépatique chez la dinde semblent proportionnelles au niveau d'exposition alimentaire. En revanche, chez le poulet, les teneurs les plus élevées sont observées pour les animaux qui ont été exposés le plus longtemps. Peu de données existent quant à l'élimination tissulaire de l' α -ZEL. Des études de toxicocinétique plasmatique réalisées à de forts niveaux d'exposition (1,2 mg ZEN/kg de poids corporel) suggèrent un temps de demi-vie plasmatique de 1,36h chez le poulet et une élimination tissulaire rapide (Buranatragool et al., 2015). D'autres travaux chez le porc suggèrent en revanche une persistance et une accumulation tissulaire de ces toxines (Sambuu et al., 2011).

La présence d' α -ZEL total dans les foies de volailles exposées à un aliment contenant 0,5/0,6 mg ZEN/kg confirme que le dosage de l' α -ZEL total peut être utilisé chez la dinde et le poulet comme biomarqueur d'exposition à de faibles niveaux de contamination des aliments. Ce résultat est en accord avec de nombreux travaux réalisés dans différentes espèces animales et chez l'homme (Solfrizzo et al., 2011).

CONCLUSION

En conclusion, ces études montrent que le dosage de l'alpha-zéaralénol hépatique total peut être utilisé comme biomarqueur d'exposition à la zéaralénone chez la dinde et le poulet. De même, le dosage de la FB1 hépatique, peut être utilisé comme biomarqueur d'exposition aux FBs, y compris lors d'exposition à de faibles doses, inférieures aux maxima recommandés en Europe. Ce dosage permet de révéler une exposition à des doses de FBs dans l'aliment sans effet sur le rapport Sa/So, considéré jusqu'à présent comme le biomarqueur le plus sensible.

Cette étude a été financée par le CAS DAR (projet 2012-2015 MYCOVOL) et a été réalisée dans le cadre de l'UMT Biologie Intégrative Recherche et Développement (BIRD).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afssa, 2009. Eval des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires. pp308
 Antonissen G. et al., 2015. Toxins, (7), 560-71.
 Buranatragool K. et al., 2015. Toxicol Rep. (2), 351-356.
 Efsa, 2017. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851
 Kolf-Clauw M. et al., 2007. Revue Méd. Vét., (158), 504-508.
 Kolf-Clauw M et al., 2008. Food Chem. Toxicol., 46(5), 1467-1473.
 Magnin, M. et al., 2016, INRA Productions Animales, (29), 217-232.
 Sambuu R. et al., 2011, J Reprod Dev. (2), 303-306.
 Shephard GS. et al., 2007. Food Addit Contam. (10), 1196-1201.
 Solfrizzo M. et al., 2011, Anal Bioanal Chem (401), 2831-2841.
 Tardieu D. et al., 2008a. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. (870), 140-144.
 Tardieu D. et al., 2008b. Food Chem Toxicol., (46), 3213-3218
 Tardieu D. et al., 2009. Chem-Biol. Interact., (182), 239-244.
 Tran S.T. et al., 2003, Chem. Biol. Interact., (146), 61-72.
 Tran S.T. et al., 2006a, Chem. Biol. Interact., (160), 51-60
 Tran S.T. et al., 2006b, Chem. Biol. Interact., (160), 41-50
 Travel A. et al., 2017. 12e JRA- JRFG, 5-6/04/2017, p1110-1114.
 Travel A. et al., 2019. 13e JRA- JRFG, 20-21/03/2019, in press.

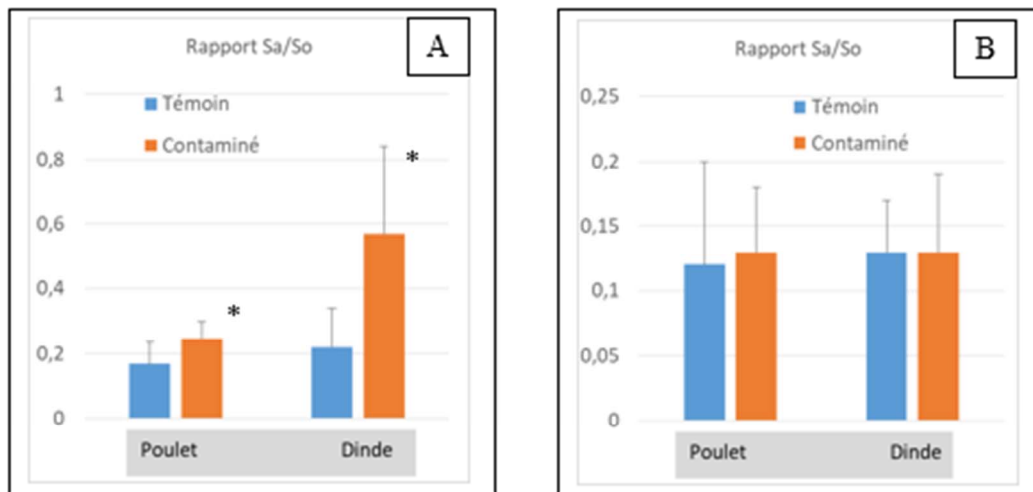


Figure 1. Rapport sphinganine/sphingosine (Sa/So) hépatique chez le poulet et la dinde après distribution d'un aliment contenant 20 (A) et 7,5 (B) mg FB1+FB2/kg. * Différence significative (ANOVA, P<0,05).

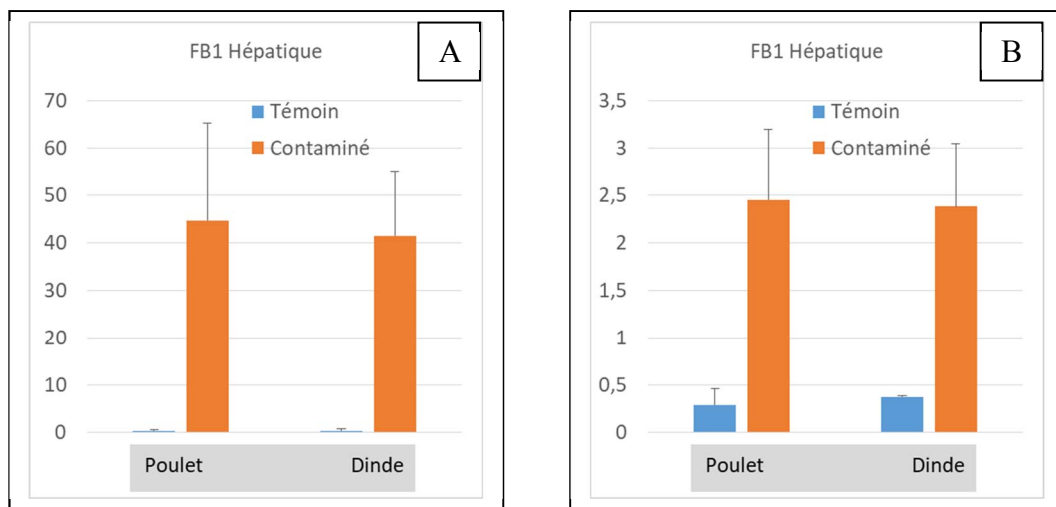


Figure 2. Concentrations hépatiques en FB1 (µg/kg) chez le poulet et la dinde après distribution d'un aliment contaminé contenant 20 mg FB1+FB2/kg (A) et 7,5 mg FB1+FB2/kg (B).

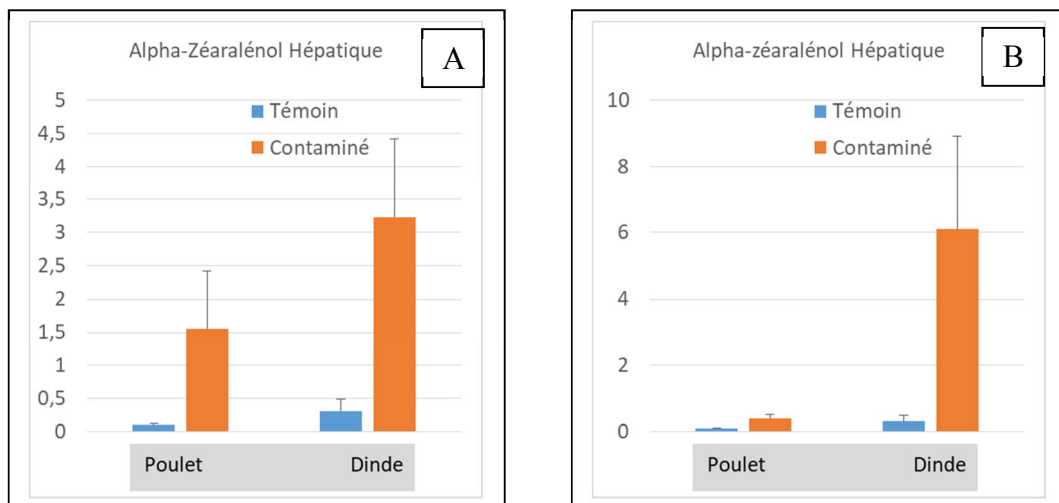


Figure 3. Concentrations hépatiques en alpha-zéaralénol (µg/kg) chez le poulet et la dinde après distribution d'un aliment contaminé par la zéaralénone à 0,5 mg/kg (A) et 0,6 mg/kg (B).