

DECROISSANCE DES TENEURS HEPATIQUES EN FUMONISINES ET ZEARALENONE CHEZ LE POULET ET LA DINDE LORS DE DISTRIBUTION D'UN ALIMENT NATURELLEMENT CONTAMINE

**Travel Angélique¹, Metayer Jean Paul², Mika Amandine¹, Cleva Didier³, Boissieu Cyril³,
Le Bourhis Céleste⁴, Tardieu Didier⁵, Guerre Philippe⁵**

¹ITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

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

³Chêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;

⁴INRA, Unité 1295 PEAT Centre Recherche Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

⁵Université de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France.

travel@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude, est d'évaluer, pour le poulet et la dinde, la teneur hépatique en mycotoxines après 2 semaines d'exposition à un aliment naturellement contaminé, et après 2 ou 4j de «rinçage». Les profils en mycotoxines des aliments sont équivalents pour le poulet et la dinde : 7-8 mg Fumonisines (FBs)/kg et 0,6 mg Zearalénone (ZEN)/kg. Soixante poulets de chair et 60 dindes de chair ont été élevés au sol en 4 groupes de 15 animaux. Les animaux ont reçu de l'aliment non contaminé jusqu'à 20j d'âge pour les poulets et 55j d'âge pour les dindes. Pour chaque espèce, 3 groupes de 15 animaux ont reçu de l'aliment contaminé (J20-J34 pour les poulets et J55-J69 pour les dindes), un groupe de chaque espèce continuant de recevoir l'aliment témoin. Après 15j d'exposition, pour chaque espèce, les animaux témoins et un groupe d'animaux exposés, sont abattus après 8h de jeûne pour prélever les foies. Les deux groupes de poulets et dindes restant reçoivent alors un aliment non contaminé pendant 2 ou 4j. Les teneurs hépatiques en FBs et ZEN sont déterminées par UHPLC-MS/MS après purification sur colonne d'immuno-affinité. Des conditions d'exposition similaires (dose, mycotoxine, durée) entraînent des concentrations hépatiques similaires en FB1 dans les deux espèces alors que les teneurs en ZENs sont très supérieures chez la dinde comparativement au poulet. Les profils de décroissance en FBs et ZEN sont similaires dans les deux espèces. Une décroissance linéaire lente des FBs est observée, des teneurs résiduelles étant toujours présentes après 4 j de distribution d'aliment indemne. La ZEN a été principalement retrouvée sous forme de métabolites réduits et conjugués. Après un premier temps de décroissance rapide, une phase lente de décroissance est observée, des teneurs en alpha-zearalénol largement supérieures à la LOQ sont retrouvées après 4 j de distribution d'aliment indemne.

ABSTRACT

Decrease of FBs and ZON level in chicken and turkey liver when exposing to naturally contaminated feed

The objective of this study is to evaluate, for chicken and turkey, the hepatic mycotoxin content after 2 weeks of exposure to a naturally contaminated feed, and after 2 or 4 days of "rinsing". Mycotoxic feed profiles are equivalent for chicken and turkey: 7-8 mg FBs/kg and 0.6 mg ZON/kg. Sixty broilers and 60 turkeys were raised, in floor pens, in 4 groups of 15 animals. Poultry received diet « mycotoxin free » until 20 days of age for chickens and until 55 days of age for turkeys. For each species, 3 groups of 15 animals received the contaminated feed (D20-D34 for chickens and D55-D69 for turkeys), with one group of each species continuing to receive the control feed. After 15 days of exposure, for each species, the control animals and a group of exposed animals are slaughtered after 8h of 'no-feeding' to collect livers. The 2 remaining groups of chickens and turkeys then receive a diet « mycotoxin free » for 2 or 4 days. Liver levels of FBs and ZON are determined by UHPLC-MS/MS after purification on an immuno-affinity column. Similar exposure conditions (dose, mycotoxin, duration) result in similar hepatic concentrations of FB1 in both species, while ZON levels are much higher in turkeys than in chickens. Decrease profiles in FBs and ZON are similar in both species. A slow linear decrease in FBs is observed, with residual levels still present after 4 days of 'free mycotoxin' feed distribution. The ZON was mainly found as reduced and conjugated metabolites. After a first time of rapid decrease, a slow phase of decrease is observed, alpha-zearalenol levels much higher than the quantification limit are found after 4 days of 'free mycotoxin' feed distribution.

INTRODUCTION

La demande du consommateur de disposer d'aliments sains et sûrs est légitimée par les autorités publiques. Des réglementations établissent les limites maximales de certaines substances indésirables dans les denrées alimentaires pour l'Homme et dans les aliments pour animaux (Règlement CE 466/2001 modifié et Recommandation 2006/576 CE et ses modifications). Les mycotoxines, métabolites toxiques produits par certaines espèces fongiques, peuvent contaminer les céréales au champ ou au cours du stockage. Ainsi, les hommes et les animaux d'élevage peuvent être exposés à ces toxines via leur alimentation.

En France, les fusariotoxines : les trichothécènes (essentiellement déoxynivalénol (DON)), les fumonisines (FBs) et la zéaralénone (ZEN) sont les principales mycotoxines qui altèrent la qualité sanitaire des récoltes. Les teneurs de ces mycotoxines sont réglementées dans les denrées d'origine végétale destinées à l'homme et aux animaux. Cependant, aucun seuil n'est fixé pour les produits d'origine animale, bien qu'ils puissent contenir des résidus de mycotoxines.

Les données de la littérature suggèrent un niveau de transfert assez limité depuis l'aliment du bétail vers les produits animaux, aussi bien pour les FBs (Vudathala et al., 1994 ; Tardieu et al., 2008 et 2009) que la ZEN (Mirocha et al., 1982 ; Maryamma et al., 1992 ; Danicke et al., 2002). Cependant, l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux utilisés dans ces études (concentrations de toxine, une durée d'exposition, une espèce de volaille et un stade physiologique) rend difficile l'établissement de relations précises entre le niveau de contamination de l'aliment et le niveau de résidus dans les tissus animaux. Des travaux récents (Metayer et al., 2017 et Travel et al., 2017), réalisés en situation d'exposition « pire cas » (incorporation de mycotoxines aux maxima tolérés par l'UE pour l'aliment volaille) ont montré la présence, en teneur non négligeable, de fumonisines ($\approx 40\mu\text{g FB1/Kg}$), zéaralénone et ses métabolites ($1,5$ à $3 \alpha\text{-ZEL/Kg}$) dans le foie de poulets et de dindes.

L'objectif du projet a consisté à caractériser, en milieu contrôlé, le transfert des fumonisines (FBs) et zéaralénone (ZEN et métabolites) vers le foie de poulet et de dinde, lors d'une exposition chronique à un aliment naturellement contaminé (situation de « pire cas terrain »). En parallèle, l'effet de la distribution d'un aliment exempt de mycotoxines, pendant 2 ou 4 jours après arrêt de l'exposition, a été évalué sur le niveau résiduel en FBs et ZEN des foies de poulets et de dindes.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Aliments naturellement contaminés en mycotoxines

Au cours des campagnes de récolte 2012, 2013 et 2014, des lots de matières premières (maïs, blé) naturellement contaminés par des FBs et de la ZEN ont été activement recherchés. Deux lots de maïs (A : $2490 \mu\text{g/kg}$ de ZEN et B : $21700 \mu\text{g/kg}$ de FBs et $120 \mu\text{g/kg}$ de ZEN) et un lot de blé ($208 \mu\text{g/kg}$ de ZEN) ont été utilisés afin de formuler des aliments pour volailles représentatifs de la situation « la plus critique », susceptible d'être rencontrée sur 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 : $7,3 \text{ mg FBs/kg}$ et $0,6 \text{ mg ZEN/kg}$ et pour l'aliment dinde : $7,9 \text{ mg FBs/kg}$ et $0,6 \text{ mg ZEN/kg}$ (Tableau 1).

1.2. Les animaux

1.2.1. Les poulets de chair

Soixante poulets de chair (Cobb 500 mâles) ont été élevés au sol, en 4 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, tous les groupes ont été élevés selon les mêmes modalités, un ré-allotement a été effectué à J17 afin de constituer des groupes homogènes pour le poids avant l'exposition. Puis pendant 14j (J20-J34), les 3 groupes M, M2 et M4 ont reçu le même aliment contenant les mycotoxines, le dernier groupe (Témoin, T) ayant reçu sur cette même période un aliment non contaminé. A J34, 10 poulets des lots T et M ont été sacrifiés afin de prélever les foies. Les poulets des 2 autres groupes ont reçu, pendant 2 jours (M2) ou 4 jours (M4) un aliment non contaminé. Dix poulets du lot M2 ont été sacrifiés à J36 et 10 poulets du lot M4 ont été sacrifiés à J38. Pour chaque groupe, un jeûne de 8h a précédé les prélèvements.

1.2.2. Les dindes de chair

Soixante dindes de chair (Grade Maker mâles) ont été élevées au sol, en 4 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, tous les groupes ont été élevés selon les mêmes modalités, un ré-allotement a été effectué à J48 afin de constituer des groupes homogènes pour le poids. Puis pendant 14j (J55-J69), les 3 groupes M, M2 et M4 ont reçu le même aliment contenant les mycotoxines, le dernier groupe (Témoin) ayant reçu sur cette même période un aliment non contaminé. A J69, 10 dindes des lots T et M ont été sacrifiées afin de prélever les foies. Les dindes des 2 autres groupes ont reçu, à partir de J59, pendant 2 jours (M2) ou 4 jours (M4) un aliment non contaminé. Dix dindes du lot M2 ont été sacrifiées à J71 et 10 dindes du lot M4 ont été sacrifiées à J73. Pour chaque groupe, un jeûne de 8h a précédé les prélèvements.

1.3. Détermination des teneurs hépatiques en mycotoxines

Les teneurs hépatiques en FBs et en ZEN et ses métabolites ont été déterminées sur homogénats de foie conservés à -20°C par UHPLC-MS/MS après purification des échantillons sur colonnes d'immuno-affinité.

1.3.1. Fumonisines

Un gramme d'homogénat est broyé au potter dans du tampon NaCl comme précédemment décrit (Tardieu et al., 2009). Un volume fixe de U-[13C34]-FB1 et U-[13C34]-FB2 (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) est ajouté aux échantillons (12,5 µl d'une solution à 1 µg/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., 2009). L'éluat de filtration est séché et repris dans 200 µl de méthanol/eau, 10 µl sont injectés dans le système HPLC.

La séparation des FBs 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 et FB2 sont exprimées après correction des rendements de la méthode d'analyse respectivement mesurés pour chaque échantillon à l'aide de 13CFB1 et 13CFB2. Les teneurs en FB3 sont corrigées en utilisant la 13CFB1.

1.3.2. Zéaralénone

Dix grammes d'homogénats sont broyés au potter dans du tampon acétate (0,2M, pH7,2) et répartis en deux fractions aliquotes. Un volume fixe de U-[13C18]-ZEN (Romer, 3131 Getzersdorf, Austria) est ajouté à chaque homogénat (12,5 µl d'une solution à 1 µg/ml dans l'acétonitrile/eau, v/v). Les homogénats sont extraits en présence d'acétonitrile (1V/4V) et évaporés à sec. Un extrait sec est conservé au frais en vue du dosage ultérieur des formes libres de la ZEN et de ses métabolites. L'autre extrait est repris dans du tampon acétate (0,2M, pH5) et incubé une nuit à 37°C en présence de bêta-glucuronidase (Helix pomatia SIGMA, >1700 U/g) comme précédemment décrit (Kolf-Clauw M. et al., 2007). L'incubat est extrait en présence d'acétonitrile (1V/4V) et évaporés à sec, en vue du dosage ultérieur des formes totales de la ZEN et de ses métabolites (libres plus conjugués).

Les deux extraits secs sont repris dans du tampon acétate (0,2M, pH7,2) et purifiés sur colonne Easi-extract zearalenone (RBiopharm, Darmstadt, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. L'éluat de filtration est séché et repris dans 200 µl de méthanol/eau, 10 µl sont injectés dans le système HPLC.

La séparation de la ZEN et de ses métabolites 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 ZEN et métabolites sont exprimées après correction des rendements de la méthode d'analyse mesurés à l'aide de 13CZEN.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Fumonisines

L'évolution des teneurs hépatiques en FBs chez la dinde et le poulet après distribution d'un aliment contaminé par 7,3 mg FB1+FB2/kg pendant 14 jours, suivie de la distribution d'un aliment indemne pendant 4 jours est donnée, dans la Figure 1. La consommation d'aliment contaminé entraîne la présence de FB1 dans le foie pour les deux espèces, et ce malgré la réalisation d'un jeûne de 8h avant abattage des animaux. Aucune différence significative entre espèce n'est constatée, les teneurs mesurées en FB1 sont voisines de 2,5 µg FB1/kg.

La distribution d'un aliment indemne pendant 4 jours entraîne une décroissance lente des teneurs hépatiques en FB1, des teneurs faibles mais largement supérieures à la LOQ sont toujours mesurées dans les deux espèces et ce malgré la réalisation d'un jeûne de 8 heures. Chez la dinde, la décroissance est lente, un temps de demi-élimination hépatique voisin de 5 jours est calculé. Les teneurs en FB1 peuvent être ajustées selon un modèle linéaire (Figure 1A). Chez le poulet, la décroissance des teneurs hépatiques en FB1 est plus rapide, un temps de demi-élimination voisin de 2 jours est calculé. Les teneurs en FB1 peuvent être ajustées selon un modèle exponentiel (Figure 1B).

Les teneurs en FB2 et FB3 étaient généralement inférieures à la LOQ tout au long de l'essai. Les teneurs en FBs chez les animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la LOQ.

Ces résultats, qui mettent en évidence une persistance longue de la FB1 dans le foie, peuvent apparaître surprenants. En effet, des études antérieures de toxicocinétique réalisées chez les volailles suggèrent une élimination plasmatique rapide de la FB1. Le temps de demi-vie plasmatique rapporté chez la dinde était de 20 à 80 minutes selon le modèle utilisé (Tardieu et al., 2008). Un temps de demi-vie plasmatique de 106 min ayant par ailleurs été observé chez le poulet (Antonissen et al., 2015).

La persistance longue de FB1 dans le foie est néanmoins en accord avec des travaux antérieurs conduits chez le porc. La distribution d'un aliment contenant 70 mg FB1+FB2/kg pendant 22 jours ayant entraîné la persistance de FB1 dans le foie 10 jours après arrêt de l'aliment contaminé et la distribution d'un aliment indemne (Fodor et al., 2008).

2.2. Zéaralénone

La distribution chez la dinde et le poulet d'un aliment contaminé par 0,6 mg de ZEN/kg pendant 14 jours entraîne la présence de ZEN et de ses métabolites dans le foie, et ce malgré la réalisation d'un jeûne de 8h avant abattage des animaux. De fortes différences sont toutefois constatées selon les composés mesurés. Aucune trace de zéaralanone ou de ses métabolites, alpha-zéaralanol, bêta-zéaralanol, libres ou conjugués n'a pu être mise en évidence dans les échantillons. Ce résultat confirme que la réduction de la zéaralénone en zéaralanone n'est pas présente chez la volaille (Guerre, 2016).

En ce qui concerne la zéaralénone et ses métabolites réduits, alpha-zéaralanol (α -ZEL) et bêta-zéaralanol (β -ZEL), ces composés sont principalement retrouvés sous forme conjugués, aussi bien chez la dinde que le poulet. Seul l' α -ZEL a pu être régulièrement dosé sous forme libre dans les foies des animaux exposés. La ZEN et le β -ZEL libres étaient inférieurs à la LOQ dans la plus grande partie des échantillons.

L'évolution des teneurs hépatiques en formes totales de ZEN et métabolites réduits chez la dinde et le poulet après distribution d'un aliment contaminé par 0,6 mg ZEN/kg pendant 14 jours suivie de la distribution d'un aliment indemne pendant 4 jours est donnée dans la Figure 2. L' α -ZEL est le métabolite principal, aussi bien chez la dinde que le poulet. Sa teneur hépatique moyenne est voisine de 6 mg/kg chez la dinde contre 0,4 mg/kg chez le poulet. Dans les deux espèces, la ZEN représentait moins de 10% du total des composés retrouvés. Ce résultat confirme l'importance du métabolisme de la ZEN chez la volaille, et notamment la formation d' α -ZEL, considéré comme plus toxique que la zéaralénone (Guerre, 2016 ; Kolf-clauw 2008 ; EFSA, 2017). La teneur en β -ZEL représente environ 25% de la teneur en α -ZEL chez la dinde contre plus de 50% chez le poulet. Ce résultat, associé à la forte variabilité en ZEN et métabolites totaux dans les deux espèces, confirme que la volaille ne constitue pas un groupe homogène en termes de métabolisation des toxines, au

moins en ce qui concerne la ZEN. Etant donné que l' α -ZEL est considéré comme 60 fois plus oestrogénique que la ZEN, alors que le β -ZEL l'est 5 fois moins (EFSA, 2017), la mise en évidence d'une forte différence de persistance et de métabolisation entre espèces peut revêtir une importance particulière dans l'exposition humaine à ce xéno-estrogène.

Dans les deux espèces, la décroissance des teneurs hépatiques en toxines au cours du temps semble suivre un phénomène biphasique. Une première phase de décroissance rapide est observée, elle conduit à un temps de demi-élimination de la toxine inférieure à deux jours. Il semble en revanche que la clairance hépatique totale de l' α -ZEL soit longue, la pente de décroissance après 2 jours de distribution d'un aliment indemne suggère que plus de 10 jours de distribution seraient nécessaires avant d'atteindre la LOQ. Ce dernier point est toutefois à considérer avec précaution, un suivi plus prolongé dans le temps des teneurs hépatiques en toxines étant nécessaire pour le confirmer.

CONCLUSION

En conclusion, cette étude montre la présence de teneurs résiduelles en FBs, et métabolites de la ZEN dans le foie de dindes et poulets après deux semaines de distribution d'aliment contaminé à des niveaux très largement inférieurs aux maxima recommandés en Europe. Suite à cette exposition, la distribution d'un aliment indemne de mycotoxines permet de réduire la teneur hépatique en toxines, mais pas de la supprimer complètement. L'analyse des courbes de décroissance suggère une persistance longue de certains métabolites, avec de fortes différences entre espèces aviaires.

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

- Antonissen G. et al., 2015. Toxins, (7), 560-71.
 Efsa, 2017. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851.
 Fodor J. et al., 2008, Food Addit Contam., (23), 492-501.
 Guerre P., 2015. Toxins, (7), 2289-2305
 Kolf-Clauw M. et al., 2007. Revue Méd. Vét., (158), 504-508.
 Kolf-Clauw M. et al., 2008. Food Chem Toxicol., (46), 1467-1473
 Tardieu D. et al., 2008. Food Chem Toxicol., (46), 3213-8
 Tardieu D. et al., 2009. Chem-Biol. Interac., (182), 239-244.

Tableau 1. Teneurs en fusariotoxines dans les aliments expérimentaux distribués aux poulets de 20 à 34j d'âge et aux dindes de 55 à 69j d'âge (Valeur attendue : valeur estimée à partir de formulation théorique des aliments)

ALIMENTS		Essai Poulet		Essai Dinde	
		ZEN (ppm)	FBs (ppm)	ZEN (ppm)	FBs (ppm)
Témoin	Analysé	0,025	0,03	0,04	0,055
Contaminé	Analysé	0,6	7,34	0,59	7,88

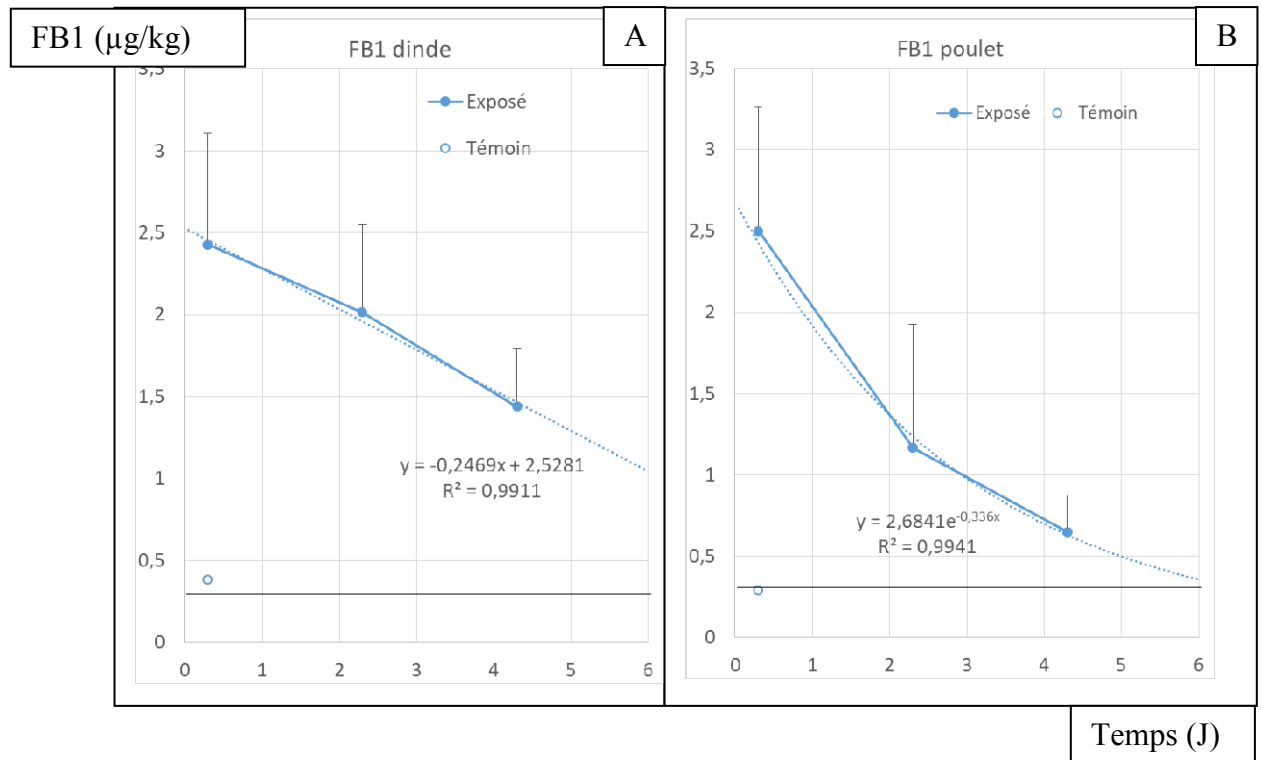


Figure 1. Evolution des concentrations hépatiques en FB1 chez la dinde (A) et le poulet (B) - ____ : LOQ

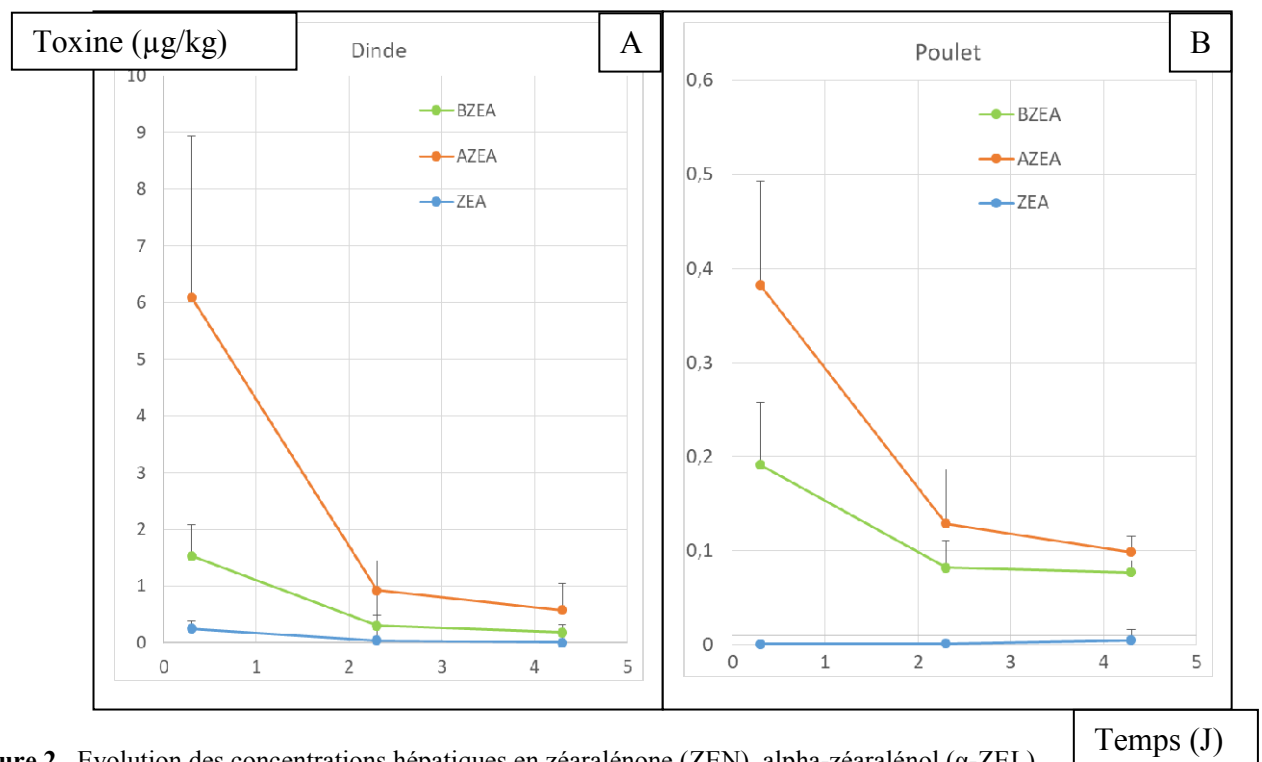


Figure 2. Evolution des concentrations hépatiques en zéaralénone (ZEN), alpha-zéaralénol (α-ZEL), bêta-zéaralénol (β-ZEL) chez la dinde (A) et le poulet (B)