

IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES EN MONO ET MULTI-CONTAMINATION SUR LES PERFORMANCES, LA SANTE ET LA QUALITE DES PRODUITS CHEZ LE CANARD AU COURS DU GAVAGE

Peillod Céline^a, Laborde Marie^a, Travel Angélique^a, Mika Amandine^a, Bailly Jean Denis^b, Cleva Didier^c, Boissieu Cyril^c, Le Guennec Jean^d, Albaric Olivier^e, Labrut Sophie^e, Froment Pascal^f, Lepivert Gurvan^g, Marengue Eric^g, Tardieu Didier^h, Guerre Philippe^h

^aITAVI, Centre INRA Val de Loire, 37380 NOUZILLY, France;

^bUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UMR Toxalim, F-31076 TOULOUSE, France;

^cChêne Vert Conseil, Z Bellevue II – 35220 CHATEAUBOURG, France;

^dFinalab, 4 bis rue Th. Botrel, BP 351, 22603 LOUDÉAC Cedex, France;

^eONIRIS, Site de la Chantrerie, BP 40706, 44307 NANTES Cédex 3, France;

^fEquipe GCR INRA – PRC - UMR INRA - CNRS - UFR - 37380 NOUZILLY, France;

^gLABOCEA, 7 rue du Sabot, CS 30054, Zoopole, 22440 PLOUFRAGAN, France;

^hUniversité de Toulouse, INP, ENVT, UR Mycotoxicologie, F-31076 TOULOUSE, France.

travel@itavi.asso.fr

RÉSUMÉ

L'objectif était de comparer l'impact zootechnique et sanitaire du déoxynivalénol (DON), des fumonisines (FBs) et de la zéaralénone (ZEA) et d'évaluer leur niveau de persistance à l'état résiduel dans les produits comestibles, suite à une mono ou multi-contamination chez le canard lors d'une exposition chronique en phase de gavage. Les mycotoxines ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes et incorporées dans des gélules distribuées aux canards, permettant de constituer les groupes suivants : lot DON (5 mg/kg), lot FBs (20 mg/kg), lot ZEA (0,5 mg/kg) et lot multi-contaminé (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs + 0,5 mg/kg ZEA) ; les canards du lot témoin recevaient des gélules contenant de la farine exempte de mycotoxines. Ces gélules ont été administrées au cours des 21 repas (2 repas/jour), en milieu de gavage, à 80 canards (MMG x PKL) de 12 semaines répartis entre les 5 groupes. L'analyse des performances a révélé, sur le lot multi-contaminé, une diminution significative ($P < 0,05$) de la croissance sans diminution notable de la prise d'aliment. A J70, l'analyse de sang n'a révélé aucune différence significative entre lots sur la biochimie plasmatique de routine et différents marqueurs de stress oxydatif. Seule une élévation significative du rapport sphinganine/sphingosine, chez les animaux exposés aux FBs par rapport aux animaux non exposés, a été observée dans le plasma, sans différence entre canards mono- ou multi-exposés. La recherche de résidus a révélé des teneurs plus élevées en FB1 dans le foie que dans les muscles, et l'absence d'effet interactif de la multi-contamination sur la persistance de ce composé.

ABSTRACT - Impact of fusariotoxins in mono and multi-contamination on performance, health and product quality in duck

The aim of this study was to compare zootechnical and health impact of deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEN) and to assess their residual persistence level in edible tissues, following a mono or multi-contamination of ducks during chronic exposure in the gavage phase. The mycotoxins were obtained by culturing toxinogenic fungal strains and incorporated in capsules distributed to ducks, to constitute the following groups: DON group (5 mg / kg), FBs group (20 mg / kg), ZEN group (0.5 mg / kg) and a multi-contaminated group (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs + 0.5 mg/kg ZEN); Ducks of control group received capsules containing flour free of mycotoxins. These capsules were given during 21 meals (2 meals/day), during the maize distribution, to 80 ducks (MMG x PKL), 12 weeks aged, divided into 5 groups. Performance analysis revealed a significant ($P < 0.05$) decrease in growth in the multi-contaminated group without significant decrease in feed intake. At day 70, blood analysis showed no significant difference between groups on routine plasma biochemistry and various markers of oxidative stress, except an elevation of sphinganine/sphingosine ratio in plasma for animals exposed to FBs compared to unexposed, without difference between single or multi-contaminated groups. The search for residues revealed higher levels of FB1 in the liver than in the muscles, and no interactive effect of multi-contamination on the persistence of this contaminant.

INTRODUCTION

Bien que les volailles soient considérées comme plus résistantes aux mycotoxines que d'autres espèces animales, leur santé et/ou performances peuvent être altérées selon les modalités d'exposition. Les effets d'une mono-contamination de l'aliment par une mycotoxine à forte dose sont bien connus (Afssa, 2009). Cependant, en cas de contamination naturelle des matières premières, les multi contaminations à faible dose se révèlent fréquentes dans les aliments. Or, peu de travaux se sont intéressés aux conséquences sur les performances, la santé et le transfert de résidus, d'une ingestion chronique et simultanée de plusieurs mycotoxines sur les volailles, comme le rappelle Metayer et al. (2017).

C'est pourquoi, dans le cadre du projet CASDAR MYCOVOL nous avons caractérisé les modalités de transfert des trois fusariotoxines les plus répandues en France (DON, FBs et ZEA) vers les produits avicoles (poulet, dinde et canard).

Dans le présent article sont présentés les résultats spécifiques au canard, pour lequel nous avons comparé l'impact zootechnique et sanitaire du DON, FBs et ZEA consommés individuellement ou en association, aux teneurs maximales recommandées pour les volailles. Leurs niveaux de persistance dans les produits destinés au consommateur humain ont été caractérisés. Cette étude apporte des éléments de réponse aux questions suivantes : Le transfert est-il comparable lors d'une mono ou multi contamination ? Selon la matrice considérée ? Existe-t-il des marqueurs biologiques spécifiques pour évaluer l'exposition des dindes aux fusariotoxines ?

Les résultats des travaux réalisés chez le poulet et chez la dinde sont présentés respectivement par Metayer et al. (2017) et Travel et al. (2017).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des canards à gaver

Les mycotoxines nécessaires à l'expérimentation ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes dans des conditions préalablement identifiées comme optimales pour la synthèse (Duverger et al., 2011). Les FBs ont été produites par culture sur maïs concassé ($aw : 0,99$) pendant 4 semaines à 25°C de *Fusarium verticillioides* (souche L12). Le DON et la ZEA ont été produits par culture pendant 4 semaines avec les souches de *F. graminearum* I159 et I171 respectivement sur blé à 23°C et riz à 21°C. Le matériel de culture produit a été séché à 90°C pendant 3h, broyé et tamisé (maille 0,6 mm) et incorporé après dosage par technique LC-MS/MS dans des gélules spécifiques pour le lot DON (5mg/kg), le lot FBs (20 mg FB1+FB2/kg), le lot ZEA (0,5 mg/kg) et le lot multi-contaminé (DON, FBs et ZEA respectivement à 5, 20 et 0,5 mg/kg).

Quatre-vingt canards (MMG x PKL) de 12 semaines ont été sélectionnés sur leur poids à partir d'un effectif de 250 canards élevés selon les pratiques habituelles. Les animaux ont été répartis en 5 lots expérimentaux. Du maïs de gavage, exempt de mycotoxines, a été distribué aux animaux, selon la pratique habituelle sur 21 ou 22 repas, avec 2 repas/jour.

Pour les canards, les quantités de mycotoxines distribuées ont été calculées pour chaque repas, en tenant compte de la quantité d'aliment administrée lors du gavage telle que prévue dans le plan d'alimentation. L'objectif était de réaliser 5 niveaux d'exposition correspondant à: un lot témoin, un lot équivalent 5mg DON/kg aliment, un lot équivalent 20 mg FBs/kg aliment, un lot équivalent 0,5 mg ZEA/kg aliment et un lot multi-contaminé (équivalent respectifs de DON, FBs et ZEA de 5, 20 et 0,5 mg/kg aliment). L'exposition a été réalisée via l'administration aux animaux, des gélules en milieu de repas. Le poids de chacune a été maintenu constant en complétant si nécessaire avec de la farine blanche. Les lots exposés aux fumonisines et à la zéaralénone ont reçu 1 gélule par repas, celui exposé au déoxynivalénol, 2 gélules par repas et enfin, le lot exposé aux 3 toxines a reçu 4 gélules par repas. Les animaux témoins ont reçu 1 gélule par repas contenant de la farine blanche non contaminée.

1.2. Suivi, prélèvements et analyses

La croissance a été enregistrée en début et fin de phase de gavage, les repas sautés étaient notés.

A l'issue des 21 ou 22 repas, et après 8h de jeûne, des prélèvements de sang ont été effectués à la veine jugulaire sur tubes secs ou tubes héparinés, centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C en vue de la détermination des paramètres hématologiques, biochimiques et de marqueurs de stress oxydatif (Zbib et al., 2014). Les animaux ont été euthanasiés par élongation des cervicales puis exsanguination et autopsiés.

Les lésions macroscopiques ont été enregistrées selon une grille lésionnelle. Les principaux organes (cœur, foie, rate, thymus, pancréas, reins, amygdales caecales, bourses de Fabricius et testicules) ont été pesés et les organes du tractus digestif (gésier, proventricule, duodénum, jéjunum, iléon et caeca) ont été vidés puis pesés. La longueur des segments digestifs a été mesurée. Les lésions microscopiques du foie, des reins, des amygdales caecales, des caeca, de la rate et de la bourse de Fabricius ont été recherchées par histologie classique. Une caractérisation de la morphométrie intestinale (duodénum, jéjunum et iléon) avec dénombrement des cellules à mucus a été effectuée. Le muscle pectoral droit (moitié) et foie (1/4) ont été homogénéisés puis congelés à -20°C pour dosage des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et de la recherche de résidus.

Le dosage de Sa et So a été effectué par HPLC-Fluo (Tran et al., 2006). La recherche de DON, FBs et ZEA a été effectuée par technique LC-MS/MS et les

métabolites de la ZEA ont été quantifiés par HPLC-Fluo (Kolf-Clauw et al., 2007). Plus de 1600 échantillons ont ainsi été générés pour analyses.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

En fin de période de gavage, les résultats montrent que l'ingestion de DON, FBs ou ZEA seules, aux teneurs que nous avons définies et dans nos conditions d'élevage, n'ont pas significativement affecté les performances de croissance, ni l'efficacité alimentaire des canards. En revanche, une diminution significative ($P < 0,05$) a été observée sur la croissance et le gain de poids dans le lot multi-contaminé sans effet significatif sur la consommation d'aliment. Ce qui s'est traduit par une diminution significative de l'efficacité alimentaire dans ce lot (Figure 1).

2.2. Autopsie et analyse histologique

Des différences significatives ($P < 0,05$) entre lots ont été observées sur le poids du duodénum et des reins, et la longueur du jéjunum, principalement impacté dans le lot multi contaminé (Figure 2). Aucune différence significative n'a été observée sur le poids relatif (% du poids vif) du pancréas, rate, cœur, proventricule, gésier, jéjunum, iléum et *caecum* des canards, lors des mono ou multi contaminations. Les observations des lésions macroscopiques réalisées par les vétérinaires au moment de l'autopsie ou microscopiques observées par histologie, n'ont révélé aucune lésion spécifique chez les lots mono-contaminés (DON, FBs ou ZEA). La multi-contamination n'a pas provoqué de lésions macro ou microscopiques en comparaison des résultats obtenus dans le lot témoin et les lots mono contaminés.

2.3. Biochimie plasmatique, hématologie, marqueurs hépatiques

L'ingestion individuelle de DON, FBs ou ZEA par les canards, n'a induit aucune différence significative ($P > 0,05$) concernant les marqueurs biochimiques sanguins (protéines totales, cholestérol, activité des phosphatases alcalines totales (PAL) et de l'alanine aminotransférase (ALAT), lactate déshydrogénase (LDH)) ni des marqueurs plasmatiques et hépatiques de stress oxydatif (malondialdéhyde (MDA), activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) de la glutathion réductase et de la glutathion peroxydase et quantité de glutathion total et réduit). Nos résultats ont montré, chez le canard, que l'ingestion simultanée des 3 fusariotoxines n'a pas modifié la réponse de ces marqueurs comparativement au lot témoin et aux lots mono contaminés.

L'étude des marqueurs hématologiques n'a pas révélé de différence significative entre les 5 lots concernant les érythrocytes, leucocytes, hétérocytes, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, monocytes et l'hémoglobine.

Le niveau de sphingosine (So) hépatique des canards était équivalent entre lots alors qu'une élévation significative de la sphinganine (Sa) a induit une élévation significative du rapport Sa/So pour les canards exposés aux FBs et multicontaminés, sans différence significative entre ces deux lots (Figure 3).

2.4. Teneurs résiduelles en fusariotoxines dans les tissus

Les teneurs en DON dans le foie et le muscle se sont révélées inférieures à la limite de détection (LD = 0,2 µg/kg) quel que soit le groupe considéré.

Les teneurs en FBs dans les foies et muscles d'animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la limite de détection (LD FB1 = 3 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables étaient retrouvées dans les lots FBs et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 1).

Seuls 4 échantillons de foie sur 14 issus du lot ZEA contenaient des teneurs détectables en alpha-zéaralénol libre (LD α -ZEA = 0,1 µg/kg). Il n'a pas été possible d'analyser les teneurs de ces toxines dans les foies par HPLC-Fluo en raison d'interférences matricielles au cours du processus d'extraction.

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cet essai a révélé l'absence d'effet individuel du DON, des FBs et de la ZEA sur les performances et la santé des canards en gavage aux doses respectives de 5, 20 et 0,5 mg/kg d'aliment. Ces résultats diffèrent de ceux précédemment observés dans la littérature (Bailly et al., 2015 ; Magnin et al., 2015) pour cette espèce lors d'exposition aux fumonisines (baisses de performances régulièrement observées) mais sont néanmoins en accord avec les recommandations européennes. Les différences de toxicité observées chez le canard lors d'exposition aux fumonisines pourraient éventuellement être attribuées au mode d'exposition des animaux (gélules). Ce travail a montré peu (indice de consommation) ou pas d'effet additif, synergique et antagoniste sur les performances et la santé des canards en gavage aux valeurs limites réglementaires pour le DON, les FBs et la ZEA, dans nos conditions standardisées d'élevage et d'exposition.

L'effet observé sur le métabolisme des sphingolipides dans les lots ingérant des FBs est en accord avec les données de Tardieu et al. (2004) chez le canard et ceux obtenus par notre équipe pour le poulet et la dinde (Métayer et al., 2017 ; Travel et al., 2017). Ces résultats confirment la possible utilisation du rapport Sa/So en tant que biomarqueur spécifique et précoce d'exposition des volailles aux FBs, son élévation précédant l'apparition de signes toxiques dans toutes les espèces où il a été évalué (Shephard et al., 2007). La multi-contamination n'a pas modifié le rapport Sa/So, comparativement aux lots mono contaminés par des FBs.

L'absence de résidus de DON dans les foies et les muscles est en accord avec les données de la bibliographie, cette toxine étant principalement sulfo-conjuguée dans les espèces aviaires (Guerre, 2015). Les teneurs en FBs observées dans les foies sont cohérentes avec des données antérieures au même niveau d'exposition (Tardieu et al., 2009). Les muscles se révèlent moins contaminés que les foies, ce qui va dans le sens des différents travaux réalisés à des niveaux supérieurs d'exposition (Guerre, 2015).

Bien que des interférences au cours de l'extraction de la ZEA et de ses métabolites aient été observées lors de l'analyse par HPLC-Fluo, les très faibles teneurs des formes libres retrouvées lors de l'analyse par LC-MS/MS suggèrent que cette toxine n'est que très faiblement présente dans les foies de canards gras.

Cette étude révèle pour la première fois, chez le canard, que la multi contamination n'a pas eu d'impact

sur les teneurs résiduelles en FBs dans les muscles et les foies, ni sur la hiérarchie de contamination des matrices, comparativement à une mono exposition avec 20 mg FBs/kg.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été conduit dans le cadre de l'UMT BIRD associant l'ITAVI et l'INRA sur des projets de recherche appliquée. Les partenaires du projet tiennent à remercier le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (CASDAR AAP 2012) pour son concours financier au projet MYCOVOL, ainsi que le RMT Quasaprove qui a apporté son soutien lors de la genèse et de la réalisation du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afssa, 2009. Rapport RCCP-Ra-Mycotoxines. pp308
 Bailly JD., Magnin M., Travel A., Guerre P., 2015. In: Actes des 11emes JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 462-475.
 Duverger F., Bailly S., Querin A., Pinson-Gadais L., Guerre P. Et Bailly J.D., 2011. Rev. Méde. Vét., 162(2), 93-97.
 Guerre P., 2015. Toxins, 7(6), 2289-2305.
 Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2007. Rev. Méd. Vét., 158(10), 504-508.
 Magnin, M., Travel, A., Bailly, J. D., Guerre, P. 2015. In: Actes des 11emes JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 476-502.
 Metayer J.P., Travel A., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Froment P., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., 2017. In: Actes des 12emes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
 Shephard G.S., Westhuizen L., Sewram V., 2007. Food Addit. Contam., 24, 1196-1201.
 Tardieu D, Bailly JD, Benard G, Tran TS, Guerre P., 2004. Poult. Sc., 83(8), 1287-1293.
 Tardieu D., Bailly JD., Benlashehr I., Auby A., Jouglar JY., Guerre P., 2009. Chem Biol Interact. 182(2-3):239-44.
 Tran S.T., Tardieu D., Auvergne A., Bailly J.D., Babilé R., Durand S., Benard G., Guerre P., 2006. Chem Biol Interact., 160(1), 41-50.
 Travel A., Metayer J.P., Mika A., Bailly J.D., Cleva D., Boissieu C., Le Guennec J., Albaric O., Labrut S., Le Bourhis C., Lepivert G., Marengue E., Tardieu D., Guerre P., . In: Actes des 12emes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
 Zbib N., Repussard, C., Tardieu D., Priymenko N., Domange C., Guerre P., 2014. Journ. Anim. Sc., 2014, 92 (11) : 5112 - 5123.

Figure 1. Données de gain de poids (g), de consommation d'aliment (g) et d'efficacité alimentaire des canards au cours du gavage et en fonction des mycotoxines reçues

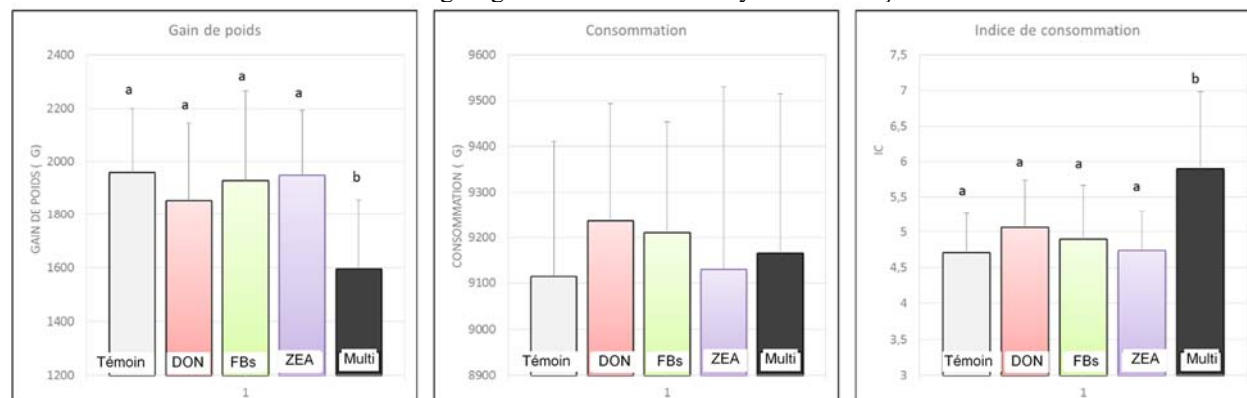


Figure 2. Longueur du jéjunum (cm), poids du duodénum (g) et des reins (g) prélevés sur les canards en fonction des mycotoxines reçues

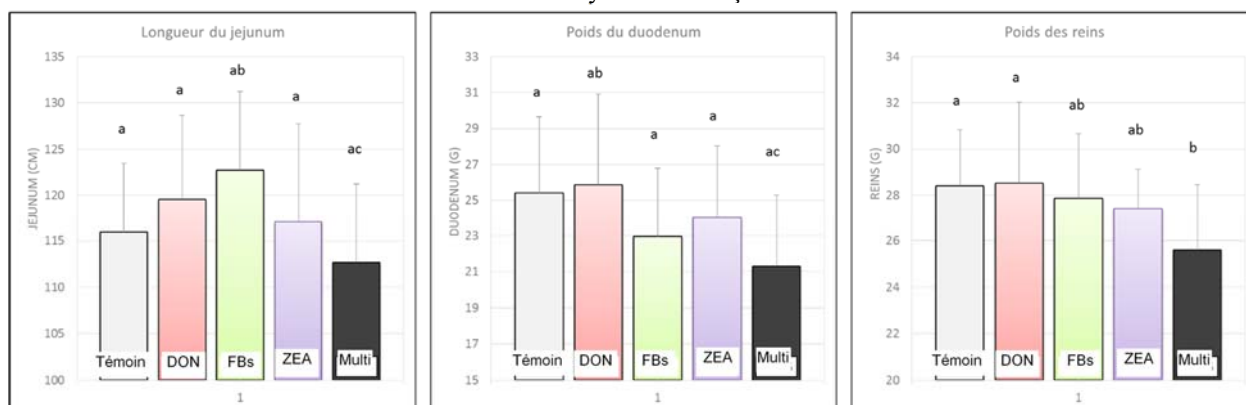


Figure 3. Concentration en sphinganine (mM), en sphingosine (mM) et ratio sphinganine/ sphingosine calculé à partir des prélèvements hépatiques des canards en fonction des mycotoxines reçues

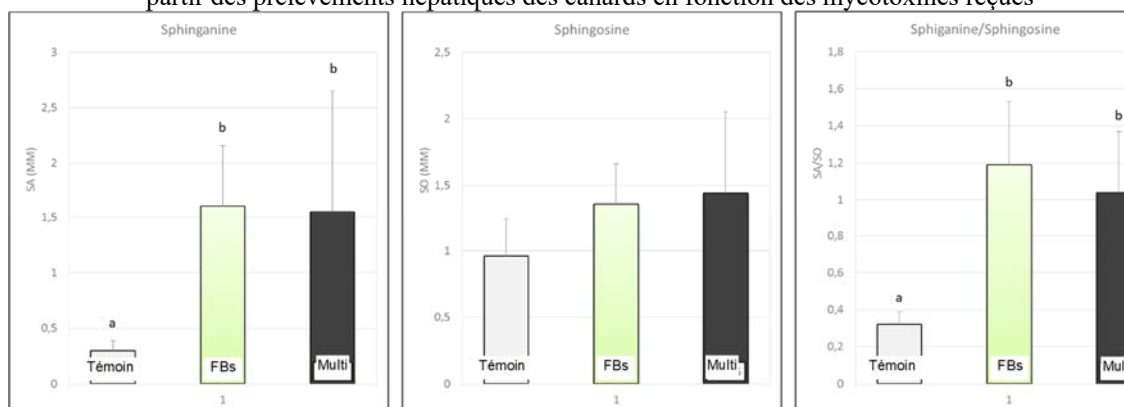


Tableau 1. Teneurs résiduelles en fumonisines (moyennes +/- écart-type, en µg FB1/kg) dans le foie et le muscle de canards exposés en phase de gavage pendant 11j soit 22 repas.

Aliment/Matrice	Témoin	FBs	Multi-contaminé
Foie	<1	10,2 +/- 2,1	11,4 +/- 3
Muscle	2,1+/-0,9	2,1 +/- 1,1	2 +/- 1