

IMPACT DES PRINCIPALES FUSARIOTOXINES EN MONO ET MULTI-CONTAMINATION SUR LES PERFORMANCES, LA SANTE ET LA QUALITE DES PRODUITS CHEZ LE POULET DE CHAIR

Metayer Jean Paul^a, Travel Angélique^b, Mika Amandine^b, Bailly Jean Denis^c, Cleva Didier^d, Boissieu Cyril^d, Le Guennec Jean^e, Froment Pascal^f, Albaric Olivier^g, Labrut Sophie^g, Le Bourhis Céleste^h, Lepivert Gurvanⁱ, Marengue Ericⁱ, Tardieu Didier^j, Guerre Philippe^j

^aARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, France;

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

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

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

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

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

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

^hPEAT, INRA Centre Val de Loire - 37380 NOUZILLY, France;

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

^jUniversité 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 poulet de chair lors d'une exposition chronique (J0-J35). Les mycotoxines ont été obtenues par culture de souches fongiques toxigènes et incorporées aux aliments expérimentaux pour obtenir un lot DON (5 mg/kg), un lot FBs (20 mg/kg), un lot ZEA (0,5 mg/kg) et un lot multi-contaminé (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs+ 0,5 mg/kg ZEA) ; l'aliment du lot témoin ne contenait pas de mycotoxines. Ces aliments ont été individuellement distribués à 70 animaux répartis entre les 5 lots. L'exposition aux mycotoxines n'a pas significativement altéré les performances zootechniques des poulets. A J35, 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 poulets recevant l'aliment mono- ou multi-contaminé. La recherche de résidus a révélé des teneurs plus élevées en FB1 et ZEA (formes libres et conjuguées) dans le foie que dans les muscles, et l'absence d'effet interactif de la multi-contamination sur la persistance de ces composés.

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

The aim of this study was to compare the zootechnical and health impact, and residues in edible tissues of deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEN) in single and multi-contamination in broiler for a chronic exposure (0 to 35 days of age). The mycotoxins were obtained by culturing toxinogenic fungal strains and incorporated into the experimental feeds to obtain a DON diet (5 mg / kg), a FBs diet (20 mg / kg), ZEN diet (0.5 mg / kg) and a multi-contaminated diet (5 mg/kg DON + 20 mg/kg FBs+ 0.5 mg/kg ZEN), whereas the control diet did not contain mycotoxins. These feeds were individually given to 70 animals allocated to the 5 groups. Exposure to mycotoxins did not significantly impact the zootechnical performance of broiler. At day 35, blood analysis revealed no significant difference among groups on routine plasma biochemistry and various markers of oxidative stress, except an elevation of sphinganine/sphingosine ratio (plasma and liver) 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 and ZEN (free and conjugated forms) in liver than in muscle, and no interactive effect of multi-contamination on the persistence of these contaminants.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites toxiques produits par certaines espèces fongiques pouvant contaminer les céréales au champ ou au cours du stockage. De ce fait, les volailles peuvent être fréquemment exposées à ces toxines via leur alimentation. En France, les trichothécènes de type A et B (le déoxynivalénol (DON) étant le plus présent), les fumonisines B1 et B2 (FBs) et la zéaralénone (ZEA), toutes produites par le genre *Fusarium*, sont les principales mycotoxines présentes dans les aliments des volailles.

La réglementation européenne a fixé des maxima recommandés pour certaines mycotoxines dans les aliments pour animaux (Règlement CE 32/2002 modifié et Recommandation CE 576/2006). Ces niveaux ont été établis en considérant le pouvoir toxique de chaque mycotoxine, prise individuellement et tiennent compte des différences de sensibilité entre certaines espèces animales (porcs, ruminants, chevaux). Cependant, il n'existe pas pour les volailles, de différences de seuil en fonction de l'espèce, du stade physiologique ou du type de production. Bien que les volailles soient considérées comme appartenant aux espèces les plus résistantes à ces toxines, les effets d'une mono-contamination de l'aliment par une mycotoxine à forte dose sont bien connus (baisse des performances et altération de la santé - Afssa, 2009). Or, peu de travaux se sont intéressés aux conséquences d'une ingestion chronique et simultanée de plusieurs mycotoxines sur les volailles, cas représentatifs de contaminations naturelles.

Bien qu'un transfert de ces contaminants ou de leurs métabolites dans les produits animaux soit parfois démontré, aucun seuil réglementaire n'est fixé dans les produits d'origine animale pour ces contaminants. Il existe peu de données, mais la littérature existante suggère un niveau de transfert limité, aussi bien pour les FBs (Vudathala et al., 1994 ; Tardieu et al., 2008 et 2009), la ZEA (Mirocha et al., 1982 ; Maryamma et al., 1992 ; Danicke et al., 2002) et le DON (Prelusky et al., 1986, 1987 et 1989). 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. Or, si les recommandations européennes sur les teneurs maximales en mycotoxines concernent les « aliments volaille » (J.O. UE, 2006), des différences importantes de sensibilité entre les différentes espèces et/ou types de production ont été mises en évidence, notamment pour les FBs (Tran et al., 2005 ; Tardieu et al., 2007) et on ignore si la multi-contamination modifie le transfert des toxines.

L'objectif du projet CAS DAR MYCOVOL était de caractériser 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 poulet de chair, pour lequel nous avons comparé l'impact zootechnique et sanitaire du DON, des FBs et de la ZEA consommés individuellement ou en association, aux teneurs maximales recommandées dans les aliments pour volailles. Leurs niveaux de persistance dans les produits destinés au consommateur humain ont été caractérisés.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des poulets de chair

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). Cinq aliments expérimentaux (base maïs – soja) ont été constitués pour obtenir un lot témoin, un lot DON (5 mg/kg), un lot FBs (20 mg/kg du total FB1+FB2), un lot ZEA (0,5 mg/kg) et un lot multi-contaminé (DON, FBs et ZEA respectivement à 5, 20 et 0,5 mg/kg).

Soixante-dix poulets de chair (Ross PM3 mâles) ont été élevés en cages individuelles de 0 à 35 jours d'âge. Ils ont reçu les 4 aliments expérimentaux contenant les mycotoxines et l'aliment témoin de 0 à 10 jours (protéines = 22 % et EM = 2880 kcal/kg, puis de 11 à 35 jours (protéines = 19,5 % et EM = 3050 kcal/kg).

1.2. Suivi, prélèvements et analyses

Les performances zootechniques ont été enregistrées de J0 à J10 et de J11 à J35, puis calculées de J0 à J35.

A J35, après 8h de jeûne, des prélèvements de sang ont été effectués comme décrit par Travel et al. (2017) en vue de la détermination des paramètres hématologiques, biochimiques et de marqueurs du stress oxydatif. Les animaux ont été mis à mort par élongation des cervicales puis exsanguination et autopsiés. Les principaux organes ont été pesés et lésions macroscopiques et microscopiques ont été relevées selon les modalités décrites par Travel et al. (2017). Le muscle pectoral droit (moitié) et le foie (totalité) ont été prélevés pour dosage des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et la recherche de résidus de DON, FBs et ZEA (Travel et al., 2017). Plus de 1600 échantillons ont ainsi été générés pour les analyses.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

Les résultats zootechniques (gain de poids moyen quotidien (GMQ), consommation d'aliment et indice de consommation (IC) obtenus sont présentés Figure 1. Une différence significative ($P < 0,05$) entre lots a

été observée sur la consommation d'aliment mais pas sur le gain moyen quotidien ($P = 0,06$). Cette différence n'a pas entraîné de modification significative de l'indice de consommation. Les résultats montrent que l'ingestion de DON, FBs ou ZEA seules, aux teneurs que nous avons définies et dans nos conditions d'élevage des animaux, n'ont pas significativement affecté les performances de croissance, ni l'IC des poulets. De plus, l'association des trois fusariotoxines aux teneurs maximales recommandées n'a pas significativement modifié les performances de croissance, ni l'efficacité alimentaire des poulets en comparaison du lot Témoin mais également des lots mono contaminés.

2.2. Autopsie et analyse histologique

Une différence significative ($P < 0,05$) entre lots n'a été observée que sur le poids relatif au poids vif (PR) des foies. Les foies des poulets exposés à la ZEA étaient plus lourds que les autres (Figure 2). Aucune différence significative n'a été observée sur le poids relatif des organes, pancréas, reins, rate, cœur, proventricule, duodénum, gésier, jéjunum, iléum et caecum, lors des mono ou multi contaminations. Néanmoins, une légère augmentation du poids du proventricule et gésier est constatée pour les lots DON et FBs ($P > 0,05$). Les observations des lésions macroscopiques réalisées au moment de l'autopsie ou microscopiques observées par histologie, n'ont mis en évidence aucune lésion spécifiquement corrélée à l'exposition à une ou plusieurs mycotoxines, quel que soit l'organe considéré.

2.3. Biochimie plasmatique, hématologie et marqueurs hépatiques

Une différence significative entre lots ($P < 0,05$) a été observée, sur les teneurs plasmatiques en acide urique (Figure 3), pouvant éventuellement refléter un léger dysfonctionnement rénal, notamment pour les poulets mono exposés à la ZEA. Aucun effet significatif des mono contaminations ou de la multi contamination, n'a été observé sur les autres marqueurs sanguins : protéines totales, cholestérol, activité des phosphatases alcalines totales (PAL) et de l'alanine aminotransférase (ALAT), lactate déshydrogénase (LDH) ni sur les marqueurs plasmatiques 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 quantités de glutathion total et réduit. De même, aucun effet significatif des mono expositions n'a été observé sur les marqueurs hématologiques (erythrocytes, hémoglobine, leucocytes, hétérocytes, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, monocytes) ; ce résultat est également observé pour le lot multi contaminé.

De façon similaire, l'ingestion individuelle ou simultanée de DON, FBs et ZEA, n'a modifié la réponse d'aucun marqueur hépatique de stress oxydatif (MDA, activité de la CAT, de la SOD, de la

glutathion réductase et de la glutathion peroxydase et quantité de glutathion total et glutathion réduit).

Le niveau de sphingosine (So) hépatique était équivalent entre lots alors qu'une élévation significative du niveau de sphinganine (Sa) a conduit à une élévation significative du rapport Sa/So pour les poulets exposés aux FBs et ceux multicontaminés, sans différence d'augmentation 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 ($LD = 0,2 \mu\text{g/kg}$) quel que soit le groupe analysé. Les teneurs en FBs dans les foies et muscles d'animaux non exposés aux FBs étaient inférieures à la LD ($LD \text{ FB1} = 3 \mu\text{g/kg}$) alors que des teneurs quantifiables étaient retrouvées dans les lots FBs et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 1).

Les teneurs en ZEA dans les foies et muscles d'animaux non exposés à la ZEA étaient inférieures à la LD ($LD \text{ ZEA} = 0,1 \mu\text{g/kg}$) alors que des teneurs quantifiables en ZEA et alpha-zéaralénol ($LD \alpha\text{-ZEA} = 0,1 \mu\text{g/kg}$), libres et conjugués, étaient retrouvées dans les foies mais pas dans les muscles des lots ZEA et multicontaminés sans différence significative entre ces deux lots (Tableau 2). Les teneurs en zéaralénols et β -zéaralénone étaient inférieures à la LD dans les foies et muscles.

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 poulets aux doses respectives de 5, 20 et $0,5 \text{ mg/kg}$ d'aliment. Ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques pour cette espèce et confirment les maximas recommandés dans l'Union Européenne pour ces toxines dans l'alimentation des volailles (Bailly et al., 2015; Magnin et al., 2015).

Ce travail a montré l'absence d'effet additif, synergique et antagoniste sur les performances et la santé des poulets en croissance 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 Grenier et al. (2015) pour le poulet, et ceux obtenus par notre équipe pour la dinde et le canard (Travel et al., 2017 ; Peillod 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

(Travel et al., 2017 ; 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 de poulets est en accord avec les données de la bibliographie, cette toxine étant principalement sulfo-conjuguée dans les espèces aviaires (Guerre, 2015). Pour les Fumonisin, les teneurs révélées dans notre étude sont voisines de celles observées au même niveau d'exposition chez la dinde (Travel et al., 2017 ; Tardieu et al., 2008). 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).

L'analyse des teneurs résiduelles en ZEA et ses métabolites confirme que cette toxine est principalement réduite en α -ZEA, dont les propriétés xéno-oestrogéniques sont supérieures à celles de la ZEA. Comme dans notre étude sur la dinde (Travel et al., 2017), ZEA et α -ZEA sont également retrouvés dans les tissus sous formes conjuguées, en accord avec les données de la littérature chez la volaille (Guerre, 2015, Kolf-Clauw et al., 2008). La signification toxicologique pour l'Homme et l'animal, de ces formes conjuguées est débattue. Chez l'animal, les métabolites conjugués sont généralement considérés comme peu toxiques, mais

leur hydrolyse après ingestion conduit à la libération des formes libres (Guerre, 2015).

Cette étude révèle pour la première fois, chez le poulet, que la multi contamination n'a pas eu d'impact sur les teneurs résiduelles en FBs et ZEA dans les muscles et les foies, ni sur la hiérarchie de contamination des tissus, comparativement à une mono exposition avec 20 mg /kg de FBs ou 0,5 mg ZEA/kg.

Ces résultats et ceux obtenus également sur la dinde (Travel et al., 2017) et le canard (Peillod et al., 2017) suggèrent que ces mycotoxines agissent indépendamment et qu'il serait inutile de tester les nombreuses combinaisons possibles mycotoxine (FBs, ZEA) x doses pour en évaluer les effets.

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. 11e JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 462-475.
- Dänicke S., Ueberschär K.H., Halle I., Matthes S., Valenta H., Flachowsky G., 2002. Poult. Sc. 81(11), 1671-1680.
- Grenier B., Schwartz-Zimmermann H.E., Caha S., Moll W.D., Schatzmayr G. et Applegate T.J., 2015. Toxins, 7(4), 1253-1272.
- Guerre P., 2015. Toxins, 7(6), 2289-2305.
- Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2008. Food Chem. Tox., 46(5), 1467-1473.
- Magnin, M., Travel, A., Bailly, J. D., Guerre, P. 2015. 11e JRA- JRFG, 25-26/03/2015, 476-502.
- Maryamma K.I., Manomohan C.B., Nair M.G., Ismail P.K., Sreekumaran T., Rajan A., 1992. Ind. Journ. Anim. Sc., 62, 105-107.
- Mirocha C.J., Robisona T.S., Pawlosky R.J., Allen N.K., 1982. Tox. & Appl. Pharm., 66(1), 77-87.
- Peillod C., Laborde M., Travel A., 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., 2017. 12e JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
- Prelusky D.B., Hamilton R.M.G., Trenholm H.L., 1989. Poultry Science, 68 (6), 744-748.
- Prelusky DB, Hamilton R.M.G., Trenholm H.L., Miller J.D., 1986. Appl. Tox., 7, 635-645.
- Prelusky, D.B., Trenholm H.L., Hamilton R.M.G., Miller J.D., 1987. Journ. Agric. Food Chem., 35, 182-186.
- Shephard G.S., Westhuizen L., Sewram V., 2007. Food Addit. Contam., 24, 1196-1201.
- Tardieu D., Bailly J.D., Skiba F., Métayer J.P., Grosjean F., Guerre P., 2007. Poult. Sc., 86, 1887-1893.
- Tardieu D., Bailly JD., Benlashehr I., Auby A., Jouglar JY., Guerre P., 2009. Chem Biol Interact. 182(2-3):239-44.
- Tardieu D., Bailly JD., Skiba F., Grosjean F., Guerre P., 2008. Food Chem. Toxic., 46(9), 3213-3218.
- Tran S.T., Auvergne A., Benard G., Bailly Jd., Tardieu D., Babilé R., Guerre P., 2005. Poult. Sc., 84, 22-28.
- Travel A., Métayer 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., 2017. 12e JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
- Vudathala D.K., Prelusky D.B., Ayroud M., Trenholm H.L., Miller J.D., 1994. Nat Toxins. 2(2), 81-88.

Figure 1. Consommation d'aliment (g), gain de poids moyen quotidien (g/j) et indice de consommation des poulets de chair en fonction de l'aliment reçu

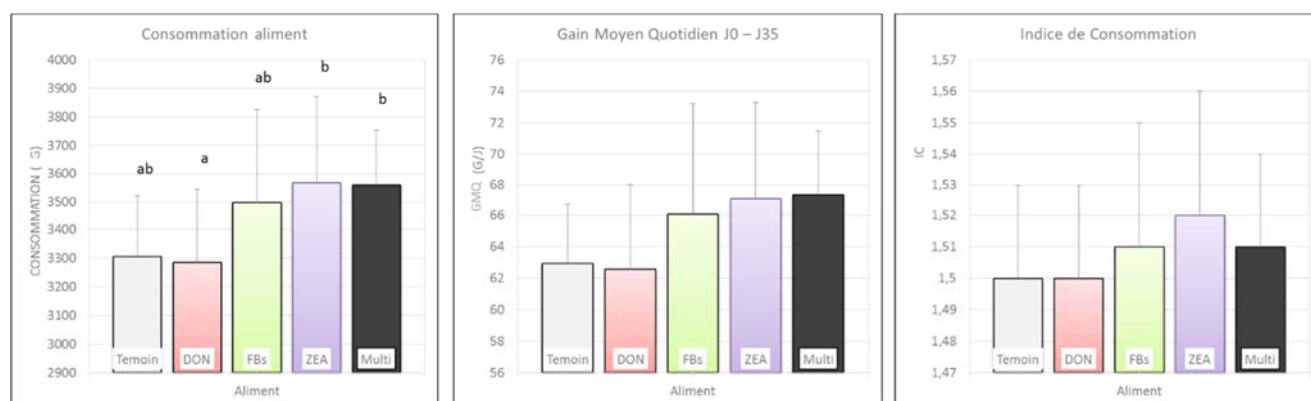


Figure 2. Poids relatif du foie et du proventricule (%) des poulets de chair en fonction de l'aliment reçu

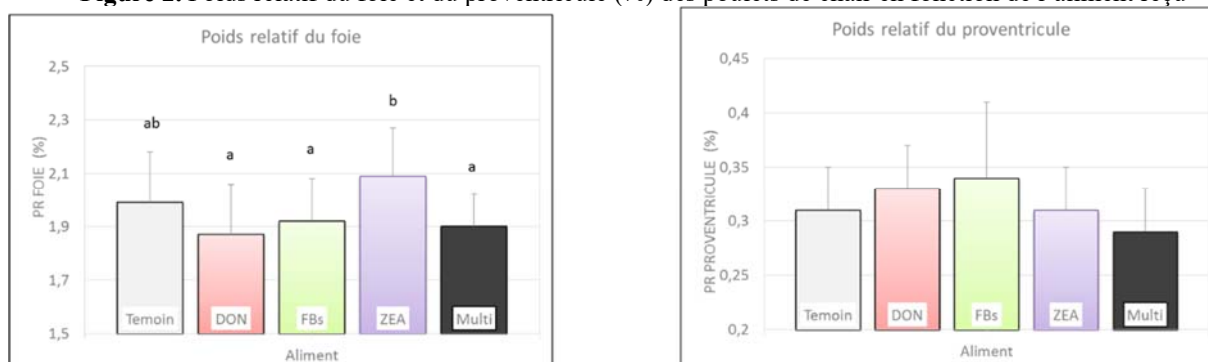


Figure 3. Concentration d'acide urique plasmatique (mg/L) et ratio sphinganine/ sphingosine hépatique des poulets de chair en fonction de l'aliment reçu

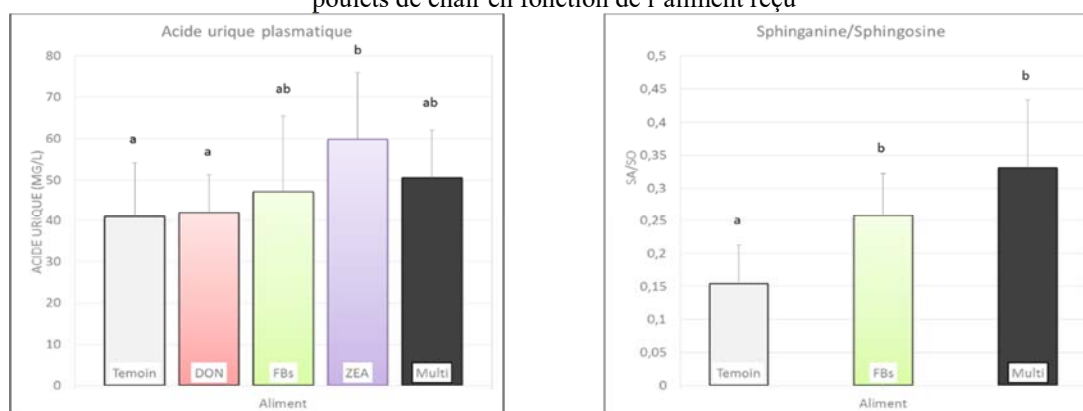


Tableau 1. Teneurs résiduelles en fumonisines (moyenne +/- écart-type, en µg FB1 /kg) dans le foie et le muscle de poulets exposés 35 j

Aliment/Matrice	Témoin	FBs	Multicontaminé
Foie	<1	50,6 +/- 14	44,7 +/- 14,2
Muscle	1,3 +/- 1,4	8,1 +/- 6,2	7,3 +/- 5,4

Tableau 2. Teneurs résiduelles en zéaralénone et α-zéaralénol (moyennes +/- écart-type, en µg/kg) dans le foie de poulets exposés 35 j

Aliment/Foie	Témoin	ZEA	Multicontaminé
ZEA libre	<0,2	0,12 +/- 0,06	0,14 +/- 0,08
α-ZEA libre	<0,2	0,33 +/- 0,24	0,86 +/- 0,53
ZEA conjuguée	<0,2	0,14 +/- 0,09	0,21 +/- 0,18
α-ZEA conjugué	<0,2	1,24 +/- 0,74	1,7 +/- 0,97