

EFFETS DES AFLATOXINES ET DES FUMONISINES ET ACTION PREVENTIVE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE CIBLANT LES FUMONISINES CHEZ LES POULETS DE CHAIR

Borutova Radka¹, Rouault Mickaël¹, Tenier Christian², Mallmann Carlos A.³

¹BIOMIN Holding GmbH - Industriestrasse, 21, - 3130 HERZOGENBURG (Autriche)

²BIOMIN France - Parc Technologique du Zoopôle, 5 rue Jean Rostand - 22440 PLOUFRAGAN (France)

³INSTITUTO SAMITEC, Instituto de Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas Ltda. – SANTA MARIA (Brésil)

christian.tenier@biomin.net

RÉSUMÉ

Cet essai a pour objectif d'évaluer l'efficacité d'une préparation enzymatique, dégradant spécifiquement les fumonisines, à réduire les effets toxiques des aflatoxines (Afla) et des fumonisines (FUM) ajoutées à l'aliment de poulets de chair. 600 poulets de chair mâles COBB ont été élevés en cages pendant 21 jours. Ils ont été répartis de façon aléatoire dans 8 groupes (8 traitements), chaque groupe comprenant 6 ou 12 répétitions avec 10 oiseaux par répétition. Plusieurs paramètres ont été évalués : poids vif, consommation d'aliments par répétition, indice de consommation (IC) et ratio sphinganine/sphingosine (Sa:So) dans le plasma sanguin. Le ratio Sa:So a été mesuré par HPLC-MS/MS à partir d'échantillons de sang recueillis sur 12 oiseaux choisis de façon aléatoire par traitement à la fin de l'essai. L'aliment poulet de chair a été artificiellement contaminé avec 2,8 ppm d'aflatoxines (somme de l'aflatoxine B1, de l'aflatoxine B2, de l'aflatoxine G1 et de l'aflatoxine G2) et 100 ppm de fumonisines (somme de la fumonisine B1 et de la fumonisine B2). Les effets négatifs des deux mycotoxines ont été observés à travers une réduction de la consommation d'aliments dans les groupes recevant un aliment contaminé (vs groupe témoin). L'ajout de la préparation enzymatique dégradant spécifiquement les fumonisines a amélioré significativement la consommation d'aliment ($P \leq 0,05$) et le poids vif final des animaux par comparaison avec les animaux ayant reçu seulement un aliment contaminé en mycotoxines. Une augmentation du ratio Sa:So a également été notée pour les animaux consommant les aliments contaminés en FUM et Afla+FUM par rapport au groupe témoin. L'ajout de la préparation enzymatique dégradant les fumonisines a permis de diminuer les valeurs de Sa:So ($P \leq 0,05$). En conclusion, l'accumulation de sphingosine et de sphinganine dans le sérum est un bio-marqueur pertinent de l'exposition aux fumonisines.

ABSTRACT

Effects of aflatoxins and fumonisins and preventive action of fumonisin-degrading enzyme preparation in broilers

Objective was to evaluate the efficacy of a fumonisin-degrading enzyme preparation in diminishing the toxic effects of aflatoxins (Afla) and fumonisins (FUM) added to broiler diets. For 21 days, 600 day old COBB male broilers were kept in cages. Birds were randomly divided into 8 treatments with 6 or 12 replicates and 10 birds per replicate. Evaluated parameters were: body weight and feed intake per replicate (weekly); feed conversion rate (FCR) and sphinganine:sphingosine ratio (Sa:So) in blood serum. Sa:So ratio was measured by HPLC-MS/MS after blood collection from 12 randomly selected birds per treatment at the end of the trial. The feed was artificially contaminated with 2.8 ppm of aflatoxins (sum of aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1 and aflatoxin G2) and 100 ppm of fumonisins (sum of fumonisin B1 and fumonisin B2). Negative effect of both mycotoxins was observed with the feed intake of contaminated animals inferior to that of the control group. The addition of fumonisin-degrading enzyme preparation improved ($P \leq 0.05$) feed intake and final body weight of birds, when in comparison with animals given only mycotoxins. Animals consuming diets contaminated with FUM and Afla+FUM showed an increase in Sa:So when in comparison with the control group. Addition of fumonisin-degrading enzyme preparation decreased Sa:So values ($P \leq 0.05$). In conclusion, accumulation of sphingosine and sphinganine in serum is a useful biomarker for the exposure to fumonisins.

INTRODUCTION

La volaille semble être moins sensible à une exposition aux fumonisines que les porcs et les chevaux (Bryden *et al.*, 1987; Brown et Rottinghaus, 1994). Les effets toxiques des fumonisines B₁ (FB₁) sur les espèces aviaires ont déjà été bien caractérisés. Chez les poussins, les FB₁ ont été associées à des baisses de performances, des taux de sphinganine et un ratio sphinganine/sphingosine (Sa:So) élevés dans le sang, des organes hypertrophiés, des réponses immunitaires diminuées et des lésions d'organes (Ledoux *et al.*, 1992; Qureshi et Hagler, 1992; Javed *et al.*, 1993; Weibking *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1999). Cette étude a pour objectif d'évaluer l'efficacité d'une préparation enzymatique expérimentale (FDE), dégradant les fumonisines, à réduire les effets des aflatoxines et/ou des fumonisines ajoutées à fortes doses à la ration de poulets de chair.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Protocole

L'étude a été conduite dans deux pièces climatisées et ventilées. Pendant 21 jours, 600 poussins mâles d'un jour, de souche COBB, ont été élevés en cages. Chaque partie est équipée d'une mangeoire à hauteur réglable, de pipettes et d'unités de chauffage. Les animaux ont été nourris et abreuvés *ad libitum*, à l'exception des jours de pesée où les animaux ont été soumis à un jeûne de 6h avant pesée puis aux mesures d'entretien habituelles. Le régime de base est identique entre les groupes (Tableau 1). Les animaux ont été répartis aléatoirement dans 8 groupes de traitement avec 6 ou 12 répétitions par traitement, et 10 oiseaux par répétition, selon le protocole détaillé dans le Tableau 2. La durée d'exposition a été fixée à 21 jours. Les fumonisines (B1 et B2) ont été obtenues par culture d'une souche de *Fusarium moniliforme*, les aflatoxines (B1, B2, G1, G2) par culture d'une souche d'*Aspergillus parasiticus*. Les paramètres suivants ont été évalués chaque semaine : poids de chaque oiseau, ingestion alimentaire (par répétition), indice de consommation (IC) et ratio sphingosine:sphinganine (Sa:So) dans le plasma sanguin. Le ratio Sa:So a été mesuré après la collecte d'échantillons de sang chez 12 oiseaux sélectionnés par traitement de façon aléatoire. Le ratio Sa:So a été déterminé selon la méthode décrite par Castegnaro *et al.* (1996). Les extraits sont issus de l'OPA (*o*-Phthaldialdéhyde) réactive et analysés par HPLC sur

une colonne à phase inversée Superlcosil LC18 (d'après Shephard et Van Der Westhuizen, 1998), utilisant une phase mobile de méthanol et d'eau (9:1, v/v) à un débit de 1ml/min. Les sphingolipides (Sa et So) ont été détectés par fluorescence à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 340 et 455 nm respectivement, et, quantifiés en comparant les aires de standards internes de concentration connue aux aires sous les pics obtenues pour la sphinganine et la sphingosine. La préparation enzymatique dégradant les fumonisines (FDE) en combinaison avec la bentonite (utilisée aussi comme support pour l'enzyme) a été produite par Biomin Holding GmbH, Herzogenburg, Autriche.

1.2. Analyse Statistique

Les paramètres et les caractéristiques mesurés ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA). Les différences entre moyennes ont été comparées à l'aide du test de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel Statgraphics Centurion XV, version 15.1.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les tableaux 3, 4 et 5 montrent l'effet individuel ou simultané des mycotoxines sur les performances des oiseaux testés lors de cette étude. Les effets négatifs des deux mycotoxines étaient visibles dès la première semaine de l'étude, avec une ingestion alimentaire plus faible chez les animaux contaminés (FUM, Afla et FUM+Afla) par comparaison avec le groupe témoin (Tableaux 6 à 9). L'ajout de FDE a amélioré l'ingestion alimentaire dans les deux groupes (FUM et FUM+Afla) ainsi que le poids vif final des oiseaux ($P \leq 0,05$), par comparaison avec les animaux nourris avec une ration contenant des mycotoxines (Afla, FUM ou Afla+FUM). Cela a résulté en un meilleur indice de consommation à la fin de l'étude pour les animaux ayant reçu l'aliment contaminé en fumonisines seulement. L'accumulation de sphinganine et de sphingosine dans le plasma sanguin est un marqueur biologique très sensible pour évaluer l'exposition aux fumonisines. Ces bases sphingolipidiques sont toxiques pour la plupart des cellules car elles affectent la prolifération cellulaire et induisent des apoptoses ou des morts cellulaires par nécrose, elles sont associées à des effets hépato- et néphrotoxiques. Comme attendu, les animaux contaminés par FUM ou Afla+FUM (Figure 1) ont présenté un ratio sphinganine:sphingosine plus élevé par rapport au groupe témoin. L'ajout de FDE diminue significativement ces valeurs ($P \leq 0,05$). Une

exposition chronique des poulets de chair à 2,8 ppm d'aflatoxines, entre 0 et 21 jours, influence négativement le poids vif final à 21 jours d'âge (-36,2%) et l'ingestion alimentaire (-33,6%). L'ajout de 100 ppm de fumonisines (FB1+FB2) a également un impact négatif sur le poids vif (-8,1%), l'ingestion alimentaire (-4,1%) et le ratio sphingosine:sphinganine (+1940%). L'association aflatoxines et fumonisines (Afla+FUM) impactent négativement le poids vif (-42,8%), l'ingestion alimentaire (-39,5%) et le ratio sphingosine:sphinganine (+860%).

La supplémentation de 0,5% de préparation enzymatique dégradant les fumonisines (FDE) dans les rations contaminées améliore :

- le poids vif des animaux challengés par des niveaux élevés de contamination en aflatoxines (+12,1%);
- le poids vif (+6,6%), la consommation d'aliment, l'indice de consommation (-5,9%) et le ratio

sphingosine:sphinganine (-37%) d'animaux challengés par des niveaux élevés de contamination en fumonisines

- le poids vif (+12,8%), l'ingestion alimentaire (+7,2%) et le ratio sphingosine:sphinganine (-90%) d'animaux challengés par une multicontamination à des niveaux élevés en aflatoxines et fumonisines.

CONCLUSION

Les mycotoxines seules ou combinées ont des effets néfastes sur les performances des oiseaux. Les fumonisines contaminant l'aliment augmentent de façon significative le ratio sphinganine/sphingosine au niveau sanguin. L'ajout de FDE dans l'aliment permet de contrer significativement cet effet en diminuant le ratio sphinganine/sphingosine dans le sang ce qui permet d'améliorer les performances des oiseaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brown, T.P. and Rottinghaus, G.E. (1994). Avian Dis. 36: 450-454.
- Bryden, W.L., Love, R.J. and Burgess, L.W. (1987). Australian Vet. J.64: 225-226.
- Castegnaro M., Garren L., Gaucher I., Wild C.P. (1996). Nat. Toxins, 4: 284-290.
- Javed, T., Bennett, G.A., Richard, J.L., Dombrink-Kurtzman, M.A., Cote, L.M. and Buck, W.B. (1993). Mycopathologia 123: 171-184.
- Ledoux, D.R., Brown, T.P., Weibking, T.S. and Rottinghaus, G.E. (1992). J Vet Diagn. Invest. 4(3): 330-333.
- Li, Y.C., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Fritsche, K.L. and Rottinghaus, G.E. (1999). Poult. Sci. 78(9): 1275-1282.
- Qureshi, M. A. and W. M. Hagler Jr. 1992. Poult. Sci. 71:104-112.
- Shephard G.S., L. Vand DerWesthuizen. (1998). J. Chromatogr. B 710: 219-222.
- Weibking, T.S., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Turk, J.R., Rottinghaus, G.E., Wang, E. and Merrill, A.H.Jr. (1993). Poult. Sci. 72:456-466.

Tableau 1. Composition nutritionnelle des régimes expérimentaux
(Régimes standards utilisés en stations expérimentales)

Nutriments	Régime Starter [1 - 21 jours]
Protéine [%]	20
Energie métabolisable [kcal/kg]	3050
Calcium [%]	0,95
Phosphore disponible [%]	0,48
Méthionine [%]	0,39
Méthionine+Cystéine [%]	0,74
Lysine [%]	1,19

Tableau 2. Protocole expérimental

Groupe traitement (TG)	Nombre d'oiseaux	Aflatoxines* [ppm]	Fumonisinés# FB1+FB2 [ppm]	FDE [%]
Témoin	60	-	-	-
0,5% FDE	60	-	-	0,5
Afla	60	2,8	-	-
Afla+FDE	60	2,8	-	0,5
FUM	120	-	100	-
FUM+FDE	120	-	100	0,5
Afla+FUM	60	2,8	100	-
Afla+FUM+FDE	60	2,8	100	0,5

FDE – Préparation enzymatique dégradant les fumonisines

*Les aflatoxines (Afla) - (93.80% B1; 2.10% B2; 3.40% G1; 0.70% G2) ont été obtenues à partir de la souche toxigène de *Aspergillus parasiticus*.

#Les fumonisines (FUM) - (68.15% B1; 31.85% B2) ont été obtenues à partir de la souche toxigène de *Fusarium moniliforme*.

Tableau 3. Ingestion Alimentaire Moyenne (g/oiseau) – à 21 jours

Groupe traitement (TG)	Ingestion Alimentaire Moyenne (g/oiseau)	Coefficient de variation (%)
Témoin	1078 ^b	2
0,5% FDE	1105 ^a	3
Afla	722 ^c	5
Afla+FDE	733 ^c	7
FUM	1034 ^c	5
FUM+FDE	1043 ^{dc}	6
Afla+FUM	652 ^c	4
Afla+FUM+FDE	699 ^d	6

^{a-c} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, P< 0,05)

Tableau 4. Poids vif moyen (g) à 21 jours

Groupe traitement (TG)	Poids vif moyen (g)	Coefficient de variation (%)
Témoin	754 ^a	12
0,5% FDE	773 ^a	11
Afla	481 ^c	18
Afla+FDE	539 ^b	23
FUM	693 ^c	14
FUM+FDE	739 ^{ab}	12
Afla+FUM	431 ^c	19
Afla+FUM+FDE	486 ^b	14

^{a-c} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, P< 0,05).

Tableau 5. Indice de consommation (IC) entre 0 et 21 jours

Groupe traitement (TG)	Indice de consommation (IC)	Coefficient de variation (%)
Témoin	1,45 ^a	15
0,5% FDE	1,45 ^a	11
Afla	1,54 ^a	17
Afla+FDE	1,42 ^a	22
FUM	1,52 ^a	16
FUM+FDE	1,43 ^b	13
Afla+FUM	1,56 ^a	20
Afla+FUM+FDE	1,47 ^a	15

^{a-c} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, P< 0,05)

Tableau 6. Ingestion Alimentaire Moyenne (g/oiseau) de 1 à 7 jours

Groupe traitement (TG)	Ingestion Alimentaire Moyenne (g/oiseau)	Coefficient de variation (%)
Contrôle	155 ^b	4
0,5% FDE	160 ^a	5
Afla	146 ^c	1
Afla+FDE	150 ^c	5
FUM	147 ^d	4
FUM+FDE	154 ^{bc}	6
Afla+FUM	146 ^{bc}	7
Afla+FUM+FDE	141 ^d	8

^{a-d} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, P< 0,05)

Tableau 7. Ingestion Alimentaire Moyenne (g/oiseau) de 1 à 14 jours

Groupe traitement (TG)	Ingestion Alimentaire Moyenne (g/oiseau)	Coefficient de variation (%)
Contrôle	523 ^b	4
0,5% FDE	541 ^a	5
Afla	375 ^c	3
Afla+FDE	368 ^{cd}	4
FUM	504 ^d	6
FUM+FDE	522 ^{bc}	4
Afla+FUM	347 ^e	3
Afla+FUM+FDE	359 ^{de}	6

^{a-e} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, P< 0,05)

Tableau 8. Poids vif moyen (g) – après 7 jours

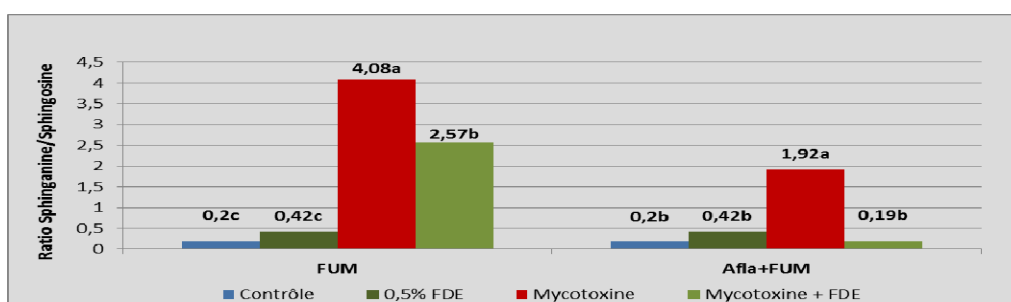
Groupe traitement (TG)	Poids vif moyen (g)	Coefficient de variation (%)
Contrôle	160 ^a	9
0,5% FDE	160 ^a	9
Afla	145 ^c	11
Afla+FDE	148 ^c	11
FUM	151 ^c	12
FUM+FDE	153 ^{bc}	11
Afla+FUM	137 ^b	10
Afla+FUM+FDE	136 ^b	11

^{a-c} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, P< 0,05)

Tableau 9. Poids vif moyen (g) – après 14 jours

Groupe traitement (TG)	Poids vif moyen (g)	Coefficient de variation (%)
Contrôle	418 ^a	13
0,5% FDE	430 ^a	12
Afla	285 ^b	14
Afla+FDE	275 ^b	13
FUM	399 ^b	16
FUM+FDE	404 ^{ab}	15
Afla+FUM	259 ^b	15
Afla+FUM+FDE	264 ^b	14

^{a-b} Résultats significativement différents (test de Bonferroni, $P < 0,05$)

**Figure 1 :** Ratio plasmatique sphinganine:sphingosine à 21 jours ($P < 0,05$)