

## ETUDE DES DEPLETIONS TISSULAIRES DU MONENSIN CHEZ LE POULET ET LA DINDE

Roudaut Brigitte<sup>1</sup>, Chéneau Estelle<sup>1</sup>, Henri Jérôme<sup>1</sup>, Burel Christine<sup>2</sup>, Maurice Robert<sup>2</sup>  
Sanders Pascal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AFSSA – Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants BP 90203 - 35302 Fougères,

<sup>2</sup>AFSSA - LERAPP Laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et aquacoles BP 53 - 22440 Ploufragan

### RÉSUMÉ

Les anticoccidiens représentent la classe de principes actifs la plus utilisée chez les volailles en France. La famille des polyéthers ionophores, est largement utilisée, comme additif dans l'aliment, pour contrôler les coccidioses chez le poulet et la dinde. Dans l'Union Européenne, les anticoccidiens sont enregistrés comme "additif" selon le règlement 1831/2003/EC du 22 septembre 2003, relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux. Les anticoccidiens sont en cours d'évaluation, dans le cadre de ce règlement, par l'Autorité Européenne de sécurité des aliments. L'objectif de notre étude était de disposer de données actualisées sur les cinétiques d'élimination d'un ionophore carboxylique, le monensin pour les espèces poulet et dinde et de contribuer à l'évaluation du risque de résidus dans les viandes pour le consommateur. Une méthode simple et sensible par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL/SM-SM) a été utilisée pour le dosage du monensin dans les muscles, le foie et la graisse. Les poulets ont été traités par voie orale pendant 33 jours avec de l'aliment contenant du monensin à la dose de 125 mg/kg et les dindes pendant 56 jours à la dose de 100 mg/kg. Les concentrations les plus importantes ont été retrouvées, chez les poulets et les dindes, dans la graisse et le foie. Ces résultats montrent que le risque de résidus de monensin dans les tissus de poulets et de dindes est limité, du fait de la faible biodisponibilité de cette molécule.

### ABSTRACT

Coccidiostats represent the most important class of drugs used for poultry in France. The group of the polyether ionophores are widely used, as feed additives, to control coccidiosis in chickens and turkeys. In the European Union, coccidiostats are registered as feed additives according to Regulation 1831/2003/EC, 22<sup>nd</sup> September 2003, concerning the additives for feed. The coccidiostats are being under revaluation by the European Food Safety Authority, in the framework of this regulation. The aim of this study was to dispose of actual data on residue depletion of one polyether ionophore : monensin in two species (chicken and turkey) and to contribute to the risk assessment of residues in meat for consumers. A simple, quantitative and sensitive method by LC-MS/MS was used for the determination of monensin in poultry muscles, liver and fat. Chickens were treated orally with medicated feed containing monensin (125 mg/kg of feed) during 33 days. Turkeys were fed with monensin (100 mg/kg) during 56 days. The more important concentrations were found in the fat and the liver of chickens and turkeys. These studies show that the risk due to residue in poultry tissues is limited, because the low availability of monensin.

## INTRODUCTION

Les anticoccidiens sont des composés qui permettent de prévenir ou de traiter les coccidioses, une maladie parasitaire causée par *Eimeria*. Les coccidioses provoquent des problèmes sanitaires sévères en aviculture et ont un impact sur les résultats technico-économiques de l'exploitation, si aucune action de prévention n'est mise en place. Le groupe des ionophores carboxyliques (monensin, narasin, salinomycine, lasalocide, maduramycine, semduramycine) est largement utilisé, comme additif dans l'alimentation animale, pour prévenir les coccidioses chez le poulet et la dinde. Ces molécules, encore appelées coccidiostats, sont enregistrées comme additifs alimentaires selon le Règlement 1831/2003/EC du 22 septembre 2003. Elles peuvent être utilisées, pour chaque espèce, à une concentration définie et pendant une durée définie avant l'abattage. La réévaluation des risques potentiels liés à leur utilisation par l'Autorité Européenne de Sécurité des aliments (AESA) aboutira à la fixation de limites maximales de résidus (LMR) pour les coccidiostats ou à leur abandon. Le monensin, une molécule largement utilisée dans le monde chez le poulet et la dinde, pouvait être administré jusqu'à 3 jours avant l'abattage (Règlements 108/2007/EC et 109/2007/EC du 5 février 2007). Néanmoins, il est connu pour ces propriétés toxiques sur le système cardio-vasculaire des animaux, pouvant être imputés à un effet sur la membrane des cellules (Shlafer, 1980) et des mitochondries (Pressman, 1976).

Dans le but d'obtenir des informations sur les concentrations résiduelles de monensin chez le poulet et la dinde, deux études ont été menées pour apprécier les concentrations tissulaires pendant et à l'arrêt du traitement en utilisant la CL/SM-SM, une technique plus sensible que celles utilisées précédemment : chromatographie sur couche mince couplée à une bioautographie (Okada et al, 1980, Donoho, 1982, Atef et al, 1993), ELISA (Godfrey et al, 1997, Crooks et al, 1997). La méthode a été validée (Cheneau et al, 2007) au préalable pour le dosage du monensin dans différents tissus de poulets et de dindes : tissu hépatique (foie), tissu adipeux (graisse abdominale), tissu musculaire de types muscle "rouge" (muscles de la cuisse) et muscle "blanc" (muscles pectoraux).

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Aliments

Le monensin, principe actif du prémélange Elancoban® (Elanco) a été incorporé aux aliments.

Ces aliments supplémentés ont été préparés sous forme de granulés par l'AFSSA – LERAPP.

### 1.2. Animaux et prélèvements

Les poulets de souche Ross, pesant 1,9 kg à la fin de l'expérimentation ont été élevés, sur parquet, à la station expérimentale de l'AFSSA – LERAPP dans des conditions les plus proches des pratiques actuelles d'élevage. L'aliment et l'eau étaient distribués *ad libitum*.

- 130 poulets ont reçu l'aliment préparé contenant du monensin à 125 mg/kg dans l'aliment, soit 20 mg/kg/jour par poulet, pendant 33 jours. A J32, des animaux (n=30) ont été sacrifiés à 5, 13 et 17 heures pour obtenir les concentrations à l'équilibre. A la fin du traitement (J33), les animaux ont été sacrifiés à 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 23, 35 et 71 heures après l'arrêt de la distribution de l'aliment supplémenté.
- Un lot de témoins a permis d'obtenir des tissus exempts de monensin.

Les dindes de souche But 9, pesant 4,3 kg à la fin de l'expérimentation ont été élevées, sur parquet, à la station expérimentale de l'AFSSA – LERAPP. L'aliment et l'eau étaient distribués *ad libitum*.

- 108 dindes ont reçu l'aliment préparé contenant du monensin à 100 mg/kg dans l'aliment, soit 5 mg/kg/jour par dinde, pendant 56 jours. A J55, des animaux (n=30) ont été sacrifiés à 5, 13 et 17 heures pour obtenir les concentrations à l'équilibre. A la fin du traitement (J56), les animaux ont été sacrifiés à 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 et 72 heures après l'arrêt de la distribution de l'aliment supplémenté.
- Un lot de témoins a permis d'obtenir des tissus exempts de monensin.

A chaque échéance, après l'arrêt de la distribution de l'aliment supplémenté, les échantillons tissulaires, foie, graisse abdominale, muscle "rouge" (muscles de la cuisse) et muscle "blanc" (muscles pectoraux) ont été prélevés sur 6 volailles, à raison de 10 g environ pour le foie, 5 g pour la graisse abdominale et 20 g pour les muscles. Ces échantillons ont été conditionnés séparément dans des sacs en plastique, identifiés par le code de l'animal, congelés puis transportés congelés à l'AFSSA-LERMVD et stockés à une température <-18°C jusqu'à l'analyse.

### 1.3. Dosage du monensin

La méthode de dosage du monensin dans les tissus a été publiée (Cheneau et al, 2007), elle est basée sur celle décrite par Rosen (2001).

#### 1.3.1. Préparation des échantillons

A 2 g de tissu sont ajoutés l'étalon interne (narasin à 50 µg/kg), puis 6 ml d'un mélange méthanol-eau (87/13, v/v). Après 10 min dans un bain à ultrasons, l'échantillon est centrifugé 10 min à 4000 g. Une fraction du surnageant (5 ml) est purifiée sur une cartouche SPE C18. La cartouche est lavée par 2 ml d'un mélange méthanol-eau (80/20, v/v) avant élution par 4 ml de méthanol. Après évaporation à sec sous courant d'azote, le résidu est dissous dans 300 µl d'un mélange acétonitrile-acétate d'ammonium 50 mM (80/20, v/v), puis transféré dans un flacon avant injection dans le système chromatographique (20 µl pour les échantillons de graisse, 50 µl pour les autres échantillons).

### 1.3.1. Dosage par CL/SM-SM

Le système chromatographique est constitué d'une pompe HP 1100 reliée à une colonne Phenomenex (150 x 2,1 mm, 3 µm). Cette dernière est connectée à un détecteur SM-SM PE Sciex API 2000. L'analyse est effectuée à l'aide de la source electrospray, en mode positif. La séparation est réalisée en gradient d'élution avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile, chacune contenant 0,1 % d'acide formique. Le débit et le volume d'injection étaient respectivement de 0,3 ml/min et 50 µl. Les concentrations en monensin dans les échantillons ont été déterminées par rapport à des gammes d'étalonnage réalisées dans le tissu correspondant. Le narasin est la molécule utilisée comme étalon interne.

### 1.4. Calcul des temps d'attente

Le calcul des temps d'attente est basé sur une analyse de régression log<sub>e</sub>-linéaire des données de dépletion tissulaire. La linéarité est testée par un test de manquement à l'ajustement, basé sur une analyse de variance. Le temps d'attente correspond à l'intersection de la borne supérieure de la zone de tolérance, à un niveau de confiance à 95%, avec la LMR. Un logiciel fourni par le CMVP de l'European Agency for Evaluation of Medicinal Products a été utilisé (Anonymous, 2002).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

La méthode de dosage du monensin a été validée dans les différents tissus selon l'approche du profil d'exactitude basé sur l'utilisation de l'erreur totale (Cheneau et al, 2007). La transition SRM la plus favorable 688,4 > 635,3 a été choisie pour la quantification. Les limites de quantification du monensin dans les différents tissus (hépatique, adipeux et musculaire) sont présentées dans le tableau 1.

Pendant la phase de distribution de l'aliment supplémenté chez le poulet, les concentrations moyennes étaient de 48,0 (ET : 20,1) µg/kg pour la

graisse, 8,8 (ET : 3,5) µg/kg pour le foie, 6,8 (ET : 1,7) µg/kg pour le muscle rouge. Les concentrations étaient plus faibles dans les muscles pectoraux (moyenne < 2,5 µg/kg) par rapport aux muscles de la cuisse. Les cinétiques d'élimination tissulaire chez le poulet sont présentées dans la figure 1. L'élimination du monensin est très rapide après l'arrêt de la distribution de l'aliment supplémenté, comme l'a décrit Atef (1993). En effet, après deux heures d'arrêt, les concentrations moyennes étaient inférieures à 2,5 µg/kg (limite de quantification) dans les muscles et après 8 heures d'arrêt, les concentrations moyennes étaient inférieures à 1 µg/kg dans le foie.

Chez les dindes, pendant la phase d'administration, les concentrations moyennes étaient plus faibles que chez les poulets : 3,6 (ET : 2,1) µg/kg pour le foie, 2,7 (ET : 1,9) µg/kg pour les muscles de la cuisse et 2,9 (ET : 1,5) µg/kg pour les muscles pectoraux. Comme pour le poulet, l'élimination du monensin est très rapide pour le foie et les muscles après l'arrêt de distribution de l'aliment supplémenté (figure 2). En revanche, elle apparaît plus lente pour le tissu adipeux. Après deux heures d'arrêt, les concentrations moyennes étaient inférieures à 2,5 µg/kg (limite de quantification) dans les muscles et après 4 heures, les concentrations moyennes étaient inférieures à 1 µg/kg dans le foie.

De manière générale, il est constaté chez le poulet et la dinde une très forte variabilité inter-individuelle, qui peut être attribuée à une prise alimentaire variable pour chaque volaille. Les concentrations plus élevées constatées dans les muscles de la cuisse par rapport aux muscles du bréchet peuvent s'expliquer par la nature lipophile du monensin, qui s'accumule dans les muscles qui contiennent le plus de lipides. Une autre explication pourrait être la vascularisation plus importante des muscles de la cuisse par rapport à celle des muscles pectoraux. La différence inter-espèces en terme de concentrations observées pour le monensin peut être expliquée par la dose plus faible administrée aux dindes et par la biodisponibilité plus importante du monensin chez le poulet que chez le dindon (Henri J. et al, soumis en 2008).

La graisse est le tissu pour lequel le temps moyen d'élimination est le plus long chez le poulet comme chez la dinde. Cependant, aucun des temps d'attente calculés (tableau 2) ne dépassent 10 h. Par conséquent, un délai d'une journée avant l'abattage de poulets et de dindes traités par voie alimentaire avec du monensin semble raisonnable. La législation fixe actuellement un temps d'attente d'au moins un jour avant l'abattage (Règlements (CE) No 1095/2008 et No 1096/2008 du 6 novembre 2008).

Depuis 2006, ces plans de contrôle organisés par la DGAI dans le foie de volailles (poulets, dindes) ne montrent pas de dépassement de LMR pour le monensin. Cependant, ils ont mis en évidence des non-conformités pour un autre ionophore, la maduramycine qui ne possède pas encore de LMR et pour d'autres familles d'anticoccidiens et en particulier pour la nicarbazine qui s'accumule dans le foie des volailles sous la forme d'un métabolite. Les LMR pour cette molécule n'ont pas encore été proposées au niveau européen. Ces non-conformités peuvent avoir plusieurs causes : le non respect du temps d'attente, la contamination croisée entre aliments blancs et aliments supplémentés lors de la fabrication de ces aliments (Mortier, 2005), de leur transport ou de leur stockage à la ferme.

## CONCLUSION

Ces études montrent que le risque de résidus de monensin dans les tissus de poulets et de dindes est limité, du fait de la faible biodisponibilité de cette molécule chez ces espèces (Henri J. et al, soumis en 2008). Dans la perspective des contrôles réglementaires, les tissus à prélever devraient être pour les ionophores de préférence le foie ou la graisse plutôt que le tissu musculaire. C'est le cas en France, où le tissu cible est le foie dans le cadre des plans de contrôle organisés par la DGAI.

Les données produites lors de ces études ont été utilisées par l'AESA lors de la réévaluation du monensin. Des limites maximales en résidus ont été proposées par l'AESA, en 2007, et fixées dans deux règlements européens (No 108/2007, No 109/2007 du 5 février 2007) : 8 µg/kg pour le foie, le rein et le muscle, 25 µg/kg pour la graisse.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anonymous, 2002. The European Agency for Evaluation of Medicinal Products. EMEA 563/02, London.
- Atef M., Ramadan A., El-Sooud A., 1993. Br. Poult. Sci., 34, 195.
- Cheneau E., Henri J., Pirottais Y., Abjean JP., Roudaut B., Sanders P., Laurentie M., 2007. J. Chromatogr. B, 850, 15-23.
- Crooks S., Traynor I., Elliott C., McCaughey W., 1997. Analyst, 122, 161.
- Donoho A., 1982. J. Anim. Sci., 58, 1528.
- Godfrey M., Luckey M., Kwasowski P., 1997. Food Addit. Contam., 14, 281.
- Henri J., Burel C., Sanders P., Laurentie M. Soumis en 2008 à J. Vet. Pharmacol. Therap.
- Mortier L., Huet A-C, Daeseleire E., Huyghebaert G., Fodey T., Elliott C., Delahaut P., Van Peteghem C., 2005. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7142-7149.
- Note de service DGAI/SPRSPP/SDSPA, 2007, 1-10.
- Okada J., Higuchi I., Kondo S., 1980. J. Food Hyg. Soc., 21, 177.
- Pressman B.C., 1976. Annu. Rev. Biochem., 45, 501-530.
- Règlement (CE) No 1831/2003, Off. J. Eur. Commun. L. 268 (2003) 29.
- Règlement (CE) No 108/2007, Off. J. Eur. Commun. L. 31 (2007) 4.
- Règlement (CE) No 109/2007, Off. J. Eur. Commun. L. 31 (2007) 6.
- Règlement (CE) No 1095/2008, Off. J. Eur. Commun. L. 298 (2008) 3.
- Règlement (CE) No 1096/2008, Off. J. Eur. Commun. L. 298 (2008) 5.
- Rosén J., 2001. Analyst, 126, 1990.
- Shlafer M., 1980. J. Pharmacol. Exp. Ther., 214, 567-573.

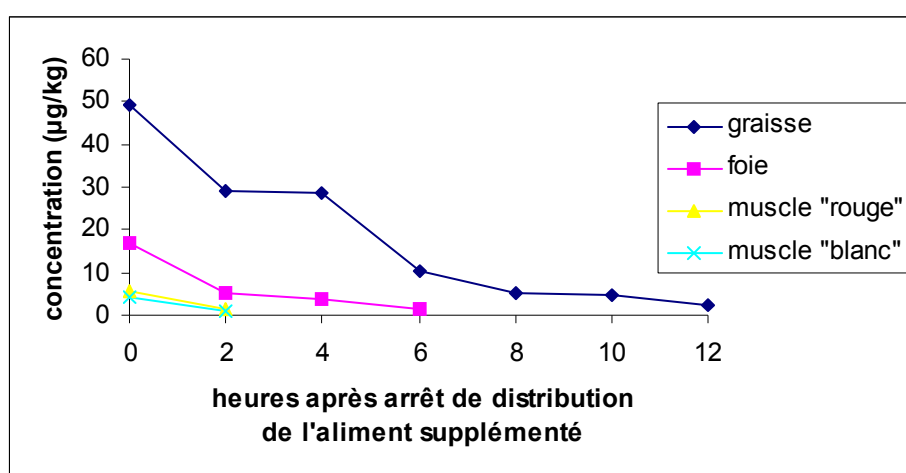
**Tableau 1.** Limites de quantification de la méthode de dosage (CL/SM-SM) du monensin dans les tissus hépatique, adipeux et musculaire de volailles.

Tissus	Limite basse (µg/kg)	Limite haute (µg/kg)
Foie	1	100
Graisse abdominale	2,5	200
Muscle	2,5	100

**Tableau 2.** Temps d'attente calculés pour les tissus hépatique, adipeux et musculaire de volailles lors d'une alimentation supplémentée en monensin.

Espèce	Concentration dans l'aliment (mg/kg)	Tissus	Temps d'attente (heure)
Poulet	125	Foie	5,89
		Graisse	8,16
		Muscle rouge	2
Dinde	100	Foie	Non déterminable
		Graisse	8,72
		Muscle rouge	Non déterminable

**Figure 1.** Cinétiques d'élimination du monensin dans le foie, la graisse et les muscles de poulets (pour chaque point, n = 6 individus) traités pendant 33 jours avec un aliment supplémenté à 125 mg/kg de monensin.



**Figure 2.** Cinétiques d'élimination du monensin dans le foie, la graisse et les muscles de dindes (pour chaque point, n = 6 individus) traitées pendant 56 jours avec un aliment supplémenté à 100 mg/kg de monensin.

