

IMPACT DES FUMONISINES SUR LA CROISSANCE ET PRINCIPAUX EFFETS SUR LES PARAMETRES BIOCHIMIQUES SPECIFIQUES ET NON SPECIFIQUES LORS D'UNE INTOXICATION CHRONIQUE CHEZ LA DINDE

Tardieu Didier ¹, Trung Tran-Sy ¹, Bailly Jean-Denis ¹, Skiba Fabien ², Métayer Jean-Paul ², Guerre Philippe ¹

¹ ENVT, Unité de Mycotoxicologie, 23 Chemin des capelles, BP 87614, 31076 Toulouse Cedex 3, France,

² ARVALIS - Institut du végétal, 21 chemin de Pau, 64121 Montardon, France

RÉSUMÉ

Les fumonisines sont des mycotoxines largement répandues dans le monde, y compris en France, produites par *Fusarium verticillioides* lors de son développement sur le maïs. Leurs effets toxiques sont bien caractérisés chez la volaille lors d'expositions aiguës alors que leurs effets sub-cliniques (impact économique, altérations sub-cliniques de la santé) et leurs toxicités chroniques sont moins connues. Chez le canard en gavage, une altération de la production est observée pour des doses supérieures à 10ppm alors que les dernières recommandations européennes suggèrent des teneurs maximales dans le maïs pouvant aller jusqu'à 60ppm, l'aliment volaille ne devant pas dépasser 20 ppm.

L'objectif des travaux présentés est de caractériser les effets des fumonisines (présentes dans de l'aliment contaminé aux doses de 0, 5, 10, 20 ppm) sur la consommation d'aliment et la croissance chez la dinde lors d'exposition pendant une période de 10 semaines. Les principaux paramètres biochimiques hépatiques et les altérations du métabolisme des sphingolipides, utilisables en tant que marqueur d'exposition et d'effet aux fumonisines, ont également été explorés au niveau plasmatique, hépatique et rénal.

Il ressort de cette étude qu'aucun effet sur la consommation alimentaire ou la croissance n'a pu être mis en évidence chez la dinde. De même, aucun paramètre biochimique plasmatique révélateur de souffrance hépatique n'a été altéré, quelle que soit la durée de l'exposition. En revanche, la caractérisation du métabolisme des sphingolipides confirme que les animaux ont bien été exposés aux toxines. Les concentrations hépatiques et rénales en sphinganine (Sa) ont augmenté de manière régulière tout au long du traitement dès la dose de 5 ppm. Cet effet est d'autant plus important et précoce que la dose est plus forte. Il conduit à une altération du rapport sphinganine/sphingosine caractéristique d'une exposition aux fumonisines dans toutes les espèces animales où il a été exploré.

ABSTRACT

Fumonisin are mycotoxins found worldwide and in France. They are produced by *Fusarium verticillioides* during its development on maize. The toxic effects of these molecules are well characterized in poultry in case of acute exposure whereas sub-clinical (economical influence, sub-clinical modification of animal's health) and chronic toxic effects are less known. During force-feeding of ducks, an alteration of the production is observed for exposure to concentrations higher than 10 ppm whereas latest European recommendations suggest that maximal levels in maize could reach 60 ppm, maximal contamination of poultry feeds being fixed to 20 ppm.

The aim of the presented studies is to characterize effects of fumonisins (found in contaminated feed at concentrations of 0, 5, 10, 20 ppm) on feed consumption and growth in turkeys exposed during 10 weeks. Main liver biochemical parameters and sphingolipid metabolism alteration, used as biomarkers of exposure and effects of the fumonisins, were investigated in plasma, liver and kidney.

This study shows that no effect on feed consumption nor on growth was found in exposed turkeys. No modification of plasmatic concentration of liver injury markers was observed. In contrary, characterization of sphingolipid metabolism clearly reveals the exposure of animals to the toxins. Both hepatic and kidney concentrations of sphinganine (Sa) increased regularly throughout the exposure period and the effect was detectable for exposure at doses as low as 5 ppm. Higher is the concentration of fumonisin stronger and precocious is the effect. It leads to an increase of the sphinganine to sphingosine ratio in liver and kidney that has been reported to be characteristic of fumonisin exposure in all species where it has been explored.

INTRODUCTION

Les fumonisines sont des mycotoxines de découverte relativement récente dont les effets varient fortement selon l'espèce (JECFA, 2002). Chez la volaille diverses affections sont associées depuis 1973 à la consommation de maïs contaminé par *F. verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*): diminution des performances, refus de s'alimenter, faiblesses, diarrhées, mortalités ... Toutefois, toutes ces pathologies ne sont sans doute pas imputables aux fumonisines. Leurs impacts sur la production aviaire apparaissent le plus souvent limités à une altération de la croissance, mais varient en fonction de l'espèce, de la dose et de la durée d'exposition (cf. Tran et al., 2005, pour une discussion des effets par espèce). A court terme, à de fortes doses (supérieures à 100 mg/kg aliment) l'administration de fumonisine B1 (FB1, la plus abondante et la plus toxique des fumonisines [Henry et al., 2001]) peut provoquer une augmentation de la mortalité. Chez les poulets et les dindes, la distribution d'un aliment contaminé à hauteur de 50 à 300 mg/kg de FB1 se traduit le plus souvent que par une baisse de l'indice de conversion alimentaire, une diminution du poids total et différentes altérations du poids des organes. Une diarrhée noirâtre et collante a également été rapportée. Chez le canard, une nette altération des performances est observée à la dose de 20 mg de FB1/kg de maïs lorsque celui-ci est distribué au cours du gavage. En phase d'élevage, la distribution d'un aliment contaminé à hauteur de 128 mg de FB1/kg n'entraîne en revanche qu'une altération réversible de la croissance.

Comme dans la plupart des espèces animales, les effets des fumonisines chez la volaille semblent associés à une atteinte hépatique. Lors d'exposition à des doses voisines de 100mg/kg d'aliment, une élévation de l'ASAT (aspartate amino-transférase), de l'ALAT (alanine amino-tranfêrase), de la GGT (gamma-glutamyl transpeptidase), de la LDH (lactate déshydrogénase), des protéines totales et de la cholestérolémie est rapportée chez le poulet alors qu'une diminution de la cholestérolémie et une augmentation de la LDH, de l'ASAT et de la GGT sont observées chez la dinde. Chez le canard en croissance, une élévation réversible dans le temps de ASAT, ALAT, GGT, LDH, protéines totales et cholestérolémie est constatée dès la dose de 32 mg de FB1/kg d'aliment. Cette élévation s'accompagne d'altérations histologiques du foie caractérisées par une désorganisation des travées et l'apparition de structures tubulo-acineuses.

Bien que de nombreuses inconnues persistent, les effets toxiques des fumonisines semblent associés à une inhibition compétitive de la céramide synthase qui conduit à différentes altérations du métabolisme des sphingolipides. Le rapport sphinganine sur

sphingosine (Sa/So) se révèle ainsi être le biomarqueur le plus sensible et le plus précoce d'exposition aux fumonisines. Cette observation, initialement effectuée chez les équidés, a été confirmée chez le canard, cette espèce se révélant une des plus sensibles aux effets des fumonisines sur le métabolisme des sphingolipides (Tran et al., 2005). Ainsi, chez le canard mulard, toute altération de performance due à une exposition aux fumonisines, qu'elle soit observée au cours de la phase d'élevage ou au cours de la phase de gavage, peut être diagnostiquée par le dosage du rapport Sa/So dans le plasma, le foie ou les reins.

L'objectif des travaux présentés est de préciser les effets des fumonisines chez la dinde au cours d'une exposition de longue durée (10 semaines). Les niveaux d'exposition explorés sont 0, 5, 10 et 20 mg de fumonisines/kg d'aliment (ppm), 20 ppm étant la plus forte dose recommandée par la CCE dans les aliments pour volailles (j.o. UE, 2006) Les effets pouvant être à l'origine d'une altération des performances zootechniques (croissance, indices) et ceux pouvant être associés à une atteinte hépatique (altérations biochimiques, spécifiques ou non) ont été explorés. Ces études sont complétées de travaux sur le devenir de la toxine et sa persistance à l'état résiduel non présentés ici.

1. MATERIELS ET METHODES

Toutes les procédures expérimentales sont conformes aux Directives Nationales Françaises pour le soin et l'usage des oiseaux dans le but de recherches.

1.1. Préparation des aliments

Les aliments ont été formulés et fabriqués par ARVALIS – Institut du végétal à la station expérimentale de Boigneville 91 selon les pratiques habituelles de façon à être iso-proteine, iso-énergie et de façon à couvrir les besoins en acides aminés (lysine, acides aminés soufrés et tryptophane) et en minéraux (Ca et Pd).

Un aliment démarrage et deux aliments croissance ont été préparés par mélange de matières premières non contaminées et incorporation de pourcentages variables (0 à 20%) d'un lot de maïs contaminé par les fumonisines (FB1 = 90 ppm ; FB1 + FB2 = 117 ppm) et d'un lot de maïs non contaminé de même origine (12 à 32%). Les niveaux de contaminations des aliments finaux obtenus sont les suivants : 0, 5, 10 et 20 ppm FB1 + FB2.

L'absence d'autres mycotoxines a été vérifiée par techniques chromatographiques et/ou kit ELISA (teneurs en aflatoxine B1, ochratoxine A, zéaralénone, déoxynivalénol et toxine T2 respectivement inférieures à 10, 10, 50, 250 et 50 µg/kg).

1.2. Animaux

300 dindons mâles de souche BUT 9 de 1 jour (J0) ont été mis en cage par groupe de 2 à la station expérimentale de Pouline. De l'aliment démarrage témoin non contaminé a été distribué pendant 1 semaine.

A l'issue de cette phase d'adaptation, 144 dindonneaux ont été répartis en 4 lots de 36 animaux sur la base de leur poids vif et placés en cage individuelle afin d'éviter le picage. Les dindons ont été pesés et la consommation d'aliment a été mesurée à J7, J14, J21, J28, J42, J56 et J70.

1.3. Prélèvements

4 à 6 animaux par lot ont été prélevés au hasard aux jours 7, 14, 21, 28, 42 et 56 et 8 à 14 animaux au jour 70. Les dindons ont été mis à jeun 8 h avant abattage, pesés et autopsiés afin de révéler une éventuelle pathologie. Des prélèvements de sang, foie, rein et muscles ont été effectués. Les différents organes ont été pesés séparément en vue de mesurer un éventuel effet des fumonisines sur les masses tissulaires.

Le sang a été prélevé avant abattage sur tube sec, puis, après coagulation, centrifugé 15 min à 3000g. Le sérum a été prélevé et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

Dix grammes de foie et de rein ont été prélevés et conservés à -20°C jusqu'à analyse. Un gramme de chaque organe a également été introduit dans un pot contenant du formol à 10 % puis stocké à température ambiante jusqu'à analyse.

Dix grammes de muscle ont été prélevés en partie haute des filets et conservés à -20°C jusqu'à analyse.

1.4. Analyses

Les teneurs sériques en cholestérol et protéines ainsi que les activités de l'ASAT (aspartate amino-transférase - EC 2.6.1.1), de l'ALAT (alanine amino-transférase - EC 2.6.1.2), et de la LDH (lactate déshydrogénase - EC 1.1.1.27) ont été déterminées sur automate Hitachi 717 à 37 °C selon les recommandations du fabricant.

Les tissus fixés ont été inclus dans la paraffine et tranchés à 4 µm. Les lames ont été colorées à l'hématoxyline - eosine en vue de leur analyse en microscopie.

Les teneurs en sphinganine et sphingosine libres ont été déterminées dans le sérum, le foie et les reins par chromatographie liquide haute performance selon la méthode précédemment décrite (Tran et al., 2003). Les résultats obtenus sont présentés sous la forme moyenne +/- S.E. obtenues sur 4 à 6 animaux en duplicate.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Effets sur la santé et les performances

Aucune mortalité et aucun signe de toxicité n'ont été observés tout au long de l'étude.

Aucun effet sur la consommation d'aliment, le gain de poids et les indices de consommation n'a été observé à quelque stade de l'élevage que ce soit (7-28j, 28-56j et 56-70j d'âge). Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus sur des dindes exposées à des aliments contaminés à hauteur de 25 et 50 ppm pendant 14 semaines, pour lesquels une diminution de la consommation avait été observée (Broomhead et al., 2002). De même aucun effet des fumonisines sur le poids des foies, des reins ou des muscles n'a pu être observé, pas plus qu'un effet sur les poids relatifs de ces différents organes ou tissus. Là encore, ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus à des doses de 25 ppm ou plus sur dindonneaux de 1 jour pour lesquels une altération du poids des organes, notamment une hépatomégalie, avait été rapportée (Weibking et al., 1993 ; Kubena et al., 1995a et b ; Ledoux et al., 1996 ; Li et al., 2000). Ces résultats confirment la plus grande résistance des dindes par rapport au canard (Tran et al., 2005).

2.2. Effets sur les marqueurs non spécifiques de souffrance hépatique

Aucun effet significatif des fumonisines sur les teneurs sériques en cholestérol, protéines et les activités ASAT, ALAT et LDH n'a été observé quelque soit l'âge des animaux et le niveau d'exposition. Ces résultats sont à mettre en relation avec les altérations biochimiques précédemment rapportées (hypocholestérolémie, hyperprotéïnémie, augmentation des activités de l'ASAT et de la LDH) lors d'exposition des animaux à des doses supérieures (Kubena et al., 1995a et b ; Ledoux et al., 1996).

2.3. Effets sur le métabolisme des sphingolipides

Aucun effet significatif des fumonisines n'a pu être mis en évidence sur les teneurs sériques en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et le rapport Sa/So tout au long de l'étude.

En revanche, une altération significative du rapport Sa/So a été obtenue dans le foie (Figure 1). Si des altérations du métabolisme des sphingolipides ont déjà été observés lors d'exposition de dindes à des doses hépatotoxiques (Broomhead et al., 2002 ; Ledoux et al., 1996), ces résultats révèlent pour la première fois dans cette espèce qu'une altération tissulaire du métabolisme des sphingolipides peut être observée avant des signes biochimiques d'hépatotoxicité. Une exposition aux fumonisines

est ainsi détectable dès le 7^{ème} jour d'exposition à la dose de 20 mg/kg d'aliment et le 14^{ème} jour d'exposition à la dose de 5 ou 10 mg de FB1/kg d'aliment. Cet effet est principalement lié à une élévation de la Sa, la So restant quasi constante dans le foie tout au cours de l'étude (Figure 2), en accord avec ce qui a été précédemment rapporté chez le canard (Tardieu et al., 2006).

De même, dans les reins, on note une altération significative du métabolisme des sphingolipides chez les animaux exposés aux fumonisines (Figure 1). Une altération significative du rapport Sa/So est observée dès le 7^{ème} jour d'exposition à la dose de 20 mg de FB1/kg d'aliment et le 14^{ème} ou le 21^{ème} jour aux doses de 10 et 5 mg/kg d'aliment. Ces altérations proviennent essentiellement d'une élévation des teneurs en Sa (Figure 3). A l'inverse de ce qui est observé dans le foie, les teneurs en So sont également légèrement augmentées, surtout à la plus forte dose d'exposition. Ce dernier effet concernant la So est en désaccord avec ce qui a été précédemment rapporté chez le canard, la So restant quasi constante tout au long de l'étude (Tardieu et al., 2006). Il confirme l'importance de l'interprétation conjointe des teneurs en Sa et du rapport Sa/So dans la détermination d'une exposition aux fumonisines.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'aucun impact économique négatif ne devrait être observé en élevage de dindes lors d'exposition aux fumonisines si on respecte les recommandations de la CEE dans les aliments pour volaille (maximum recommandé de 20 ppm). Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus chez le canard. Ils confirment que les recommandations concernant les teneurs maximales tolérables en mycotoxines chez la volaille devraient être établies par espèce et non par groupe d'espèces.

Une exposition des animaux à la toxine est toutefois détectable par mesure du rapport Sa/So dès le 7^{ème} jour d'exposition à la dose de 20 mg de fumonisines/kg d'aliment et le 14^{ème} jour aux doses de 5 ou 10 mg/kg. Ces résultats confirment que le rapport Sa/So est un biomarqueur d'exposition sensible et précoce chez la volaille.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient H. Clavé (Maïsador, France), V. Ortega et C. Florin (Syngenta Seeds, France) pour leur assistance technique et leur expertise dans la sélection des lots de maïs utilisés dans cette étude.

Les résultats présentés ont été obtenus grâce à la participation financière de Maïsador, Syngenta

Seeds, la région Midi-Pyrénées et le Ministère français de la Recherche dans le cadre du programme RARE Fusariotoxines 2003-2006.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Broomhead J.N. et al., 2002. Poult. Sci., (81), 56-61.
- Henry M.H. 2001. Poult. Sci., (80), 401-407.
- JECFA Fumonisins, World Health Organization, Geneva, 2002.
- Journal officiel UE, 23/8/2006. L229/7.
- Kubena L.F. et al., 1995b. Poult. Sci., (74), 306-313.
- Kubena L.F. et al., 1995b. Poult. Sci., (74), 1295-1303.
- Kubena L.F. et al., 1997. Poult. Sci., (76), 256-264.
- Ledoux D.R. et al., 1996. Poult. Sci., (75), 1472-1478.
- Li Y.C. et al., 2000. Poult. Sci., (79), 871-878.
- Tardieu D. et al., 2004. Poult. Sci., (83), 1287-93.
- Tardieu D. et al., 2006. Chem. Biol. Inter., (160), 51-60.
- Tran T.S et al., 2003. Chem. Biol. Inter., (146), 61-72.
- Tran T.S et al., 2005. Poult. Sci., (84), 22-28.
- Tran T.S et al., 2006. Chem. Biol. Inter., (160), 41-50.
- Weibking T.S. et al., 1993. J. Vet. Invest., (5), 75-83.

Figure 1. Effet d'une exposition aux fumonisines sur le rapport Sphinganine/Sphingosine (Sa/So) hépatique (A) et rénal (B). -○- 0 ppm, -▲- 5 ppm, -◇- 10 ppm et -■- 20 ppm FB1 + FB2, Moyennes et S.E.

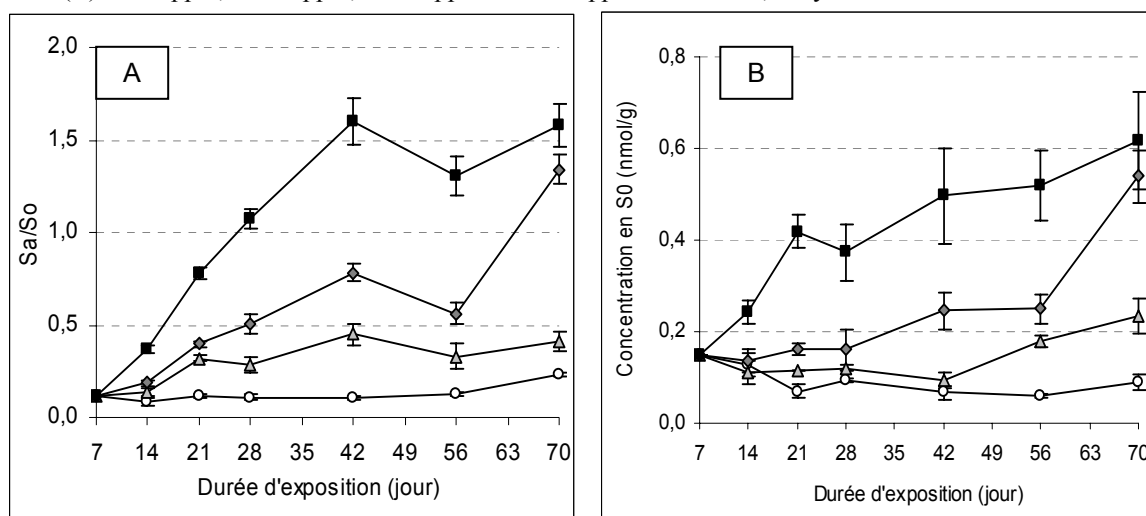


Figure 2. Effet d'une exposition aux fumonisines sur les teneurs hépatiques en Sphinganine (Sa) et en Sphingosine (So). -○- 0 ppm, -▲- 5 ppm, -◇- 10 ppm et -■- 20 ppm FB1 + FB2, Moyennes et S.E.

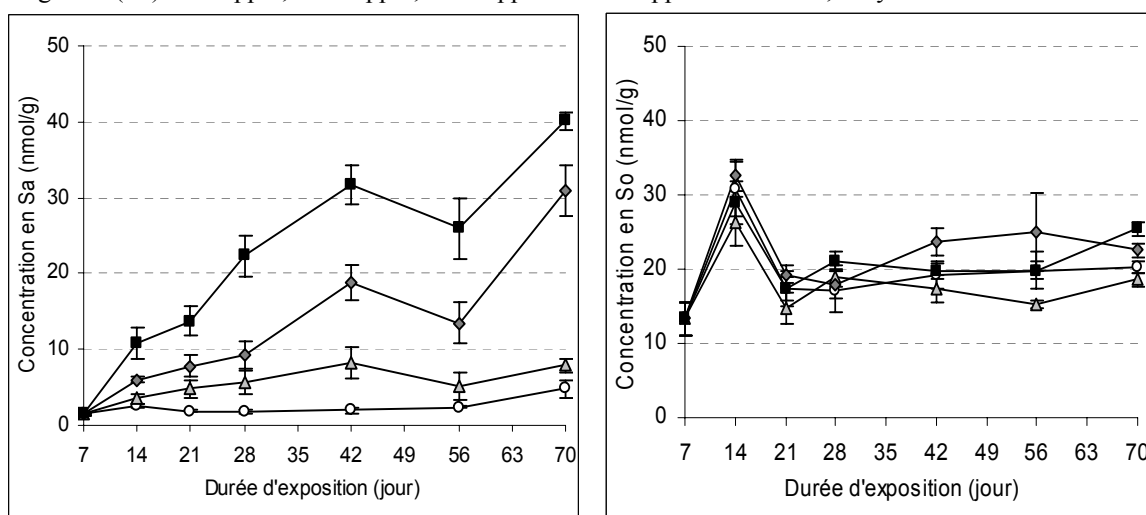


Figure 3. Effet d'une exposition aux fumonisines sur les teneurs rénales en Sphinganine (Sa) et en Sphingosine (So). -○- 0 ppm, -▲- 5 ppm, -◇- 10 ppm et -■- 20 ppm FB1 + FB2, Moyennes et S.E.

