

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

Travel Angélique^a, Metayer Jean Paul^b, Mika Amandine^a, Bailly Jean Denis^c, Cleva Didier^d, Boissieu Cyril^d, Le Guennec Jean^e, Albaric Olivier^f, Labrut Sophie^f, Le Bourhis Céleste^g, Lepivert Gurvan^h, Marengue Eric^h, Tardieu Didierⁱ, Guerre Philippeⁱ

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

^bARVALIS-Institut du Végétal, Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE, 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;

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

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

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

ⁱUniversité 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 la dinde de chair lors d'une exposition chronique (J56-J70). 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 dindes. 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 et le foie, sans différence entre dindes 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 turkey

The aim of this study was to compare zootechnical and health impact, and residues in edible tissues of deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEN) in single and multi-contamination in turkey for a chronic exposure (56 to 70 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 distributed to 70 animals affected to the 5 groups. Exposure to mycotoxins did not significantly impact the zootechnical performance of turkeys. At day 70, 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 the liver than in the muscles, and no interactive effect of multi-contamination on the persistence of these contaminants.

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 à la dinde de chair, pour laquelle 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 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 le tissu considéré ? 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 le canard sont présentés respectivement par Metayer et al. (2017) et Peillod et al. (2017).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Exposition des dindes de chair

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 verticilloides* (souche L12). Le DON et la ZEA ont été respectivement produits par culture pendant 4 semaines avec les souches de *F. graminearum* I159 et I171 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 à 5 aliments expérimentaux (base maïs – soja) 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 dindes de chair (Grade Maker mâles) ont été élevées en cages individuelles de 0 à 55 jours d'âge avec un aliment démarrage (J0-J27) puis un aliment croissance 1 (J28-J55) suivants les recommandations habituelles et indemnes de mycotoxines (< 80 µg de DON, < 20 µg de FBs, < 50 µg de ZEA /kg). Puis, chacun des 4 aliments expérimentaux contenant les mycotoxines et l'aliment témoin (protéines = 21 % et EM = 3125 kcal/kg) a été distribué individuellement à 14 dindes de 56 à 70 jours d'âge.

1.2. Suivi, prélèvements et analyses

Les performances de croissance ont été enregistrées de J28 à J56 préalablement à l'exposition puis de J56 à J70 lors de l'exposition.

A J70, après 8h de jeûne, des prélèvements de sang ont été effectués à la veine jugulaire sur tubes secs ou héparinés, centrifugés 10 minutes à 3000g à 4°C en vue de la détermination des paramètres hématologiques, biochimiques et de marqueurs du 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 le foie (totalité) ont été homogénéisés puis congelés à -20°C pour dosage des concentrations en sphinganine (Sa) et sphingosine (So) et 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 les analyses.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

A J70, aucune différence significative ($P > 0,05$) entre lots n'a été observée sur le poids vif, la consommation d'aliment (Figure 1), le gain moyen quotidien (GMQ) et l'indice de consommation (IC) des dindes (données non présentées). Ces résultats

indiquent que l'ingestion de 5 mg DON/kg, 20 mg FBs/kg ou 0,5 mg ZEA/kg, dans nos conditions d'élevage, n'ont pas significativement impacté les performances de croissance, ni l'efficacité alimentaire des dindes. De plus, les animaux ayant reçu, aux mêmes concentrations, l'association des trois fusariotoxines, ont montré des performances de croissance et efficacité alimentaire comparables aux dindes du lot Témoin et également des lots mono-contaminés.

2.2. Autopsie et analyse histologique

Aucun effet lésionnel des mycotoxines distribuées individuellement, n'a été mis en évidence au niveau macroscopique ou microscopique chez la dinde, quel que soit l'organe. Ces mono-expositions n'ont pas généré de différence significative ($P > 0,05$) sur le poids spécifique et le poids relatif (% du poids vif) des foies, pancréas, reins, rates, cœur, proventricule, duodénum, gésier, jéjunum, iléum et *caecum*, comparativement au lot témoin (Figure 2). La multi-contamination n'a pas provoqué de lésions macro ou microscopiques, ni modifié les poids des organes 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 dindes, 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 la dinde, que l'ingestion simultanée de trois 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, hémoglobine, leucocytes, hétérocytes, éosinophiles, basophiles, lymphocytes, alors qu'une élévation significative de la concentration en monocytes ($P = 0,044$) a été observée chez les dindes exposées aux FBs en comparaison des dindes exposées au DON (Figure 3).

Le niveau de sphingosine (So) hépatique était équivalent entre lots alors qu'une élévation significative de la sphinganine (Sa) a induit une augmentation significative du rapport Sa/So pour les dindes exposées aux FBs et multi-contaminées, 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 LD (LD FB1 = 3 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables ont été 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 ZEA = 0,1 µg/kg) alors que des teneurs quantifiables en ZEA et alpha-zéaralénol (LD α -ZEA = 0,1 µg/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 dindes en croissance aux doses respectives de 5, 20 et 0,5 mg/kg d'aliment. Pour la dinde, ces résultats sont en accord avec les données bibliographiques disponibles pour cette espèce et confirment les maxima recommandés en Europe 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 dindes 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 le poulet et le canard (Métayer 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 (Métayer 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 dindes 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., 2008). Ces teneurs sont voisines de celles observées au même niveau d'exposition chez le poulet (Metayer et al., 2017 et 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 le poulet (Metayer 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 la dinde, 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 matrices, comparativement à une mono exposition avec 20 mg/kg de FBs ou 0,5 mg/kg de ZEA.

Ces résultats et ceux obtenus également sur le poulet (Metayer 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. In: Actes des 11èmes 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.
- 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., 2007. Rev. Méd. Vét., 158(10), 504-508.
- Kolf-Clauw M., Ayouni F., Tardieu D., Guerre P., 2008. Food Chem. Toxic., 46(5), 1467-1473.
- Magnin, M., Travel, A., Bailly, J. D., Guerre, P. 2015. In: Actes des 11èmes 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 12èmes JRA- JRFG, 5-6/04/2017, in press.
- 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., . In: Actes des 12èmes 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., Skiba F., Grosjean F., Guerre P., 2008. Food Chem. Toxic., 46(9), 3213-3218.
- 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.
- 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 poids vif (g) et consommation d'aliment (g) des dindes de chair selon de l'aliment reçu

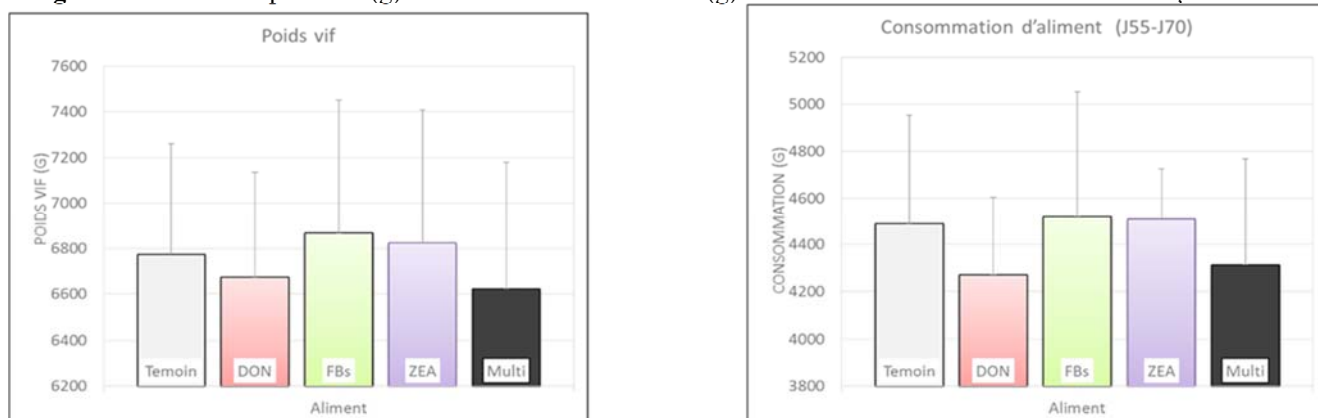


Figure 2. Poids du foie et de l'intestin (g) des dindes de chair selon de l'aliment reçu

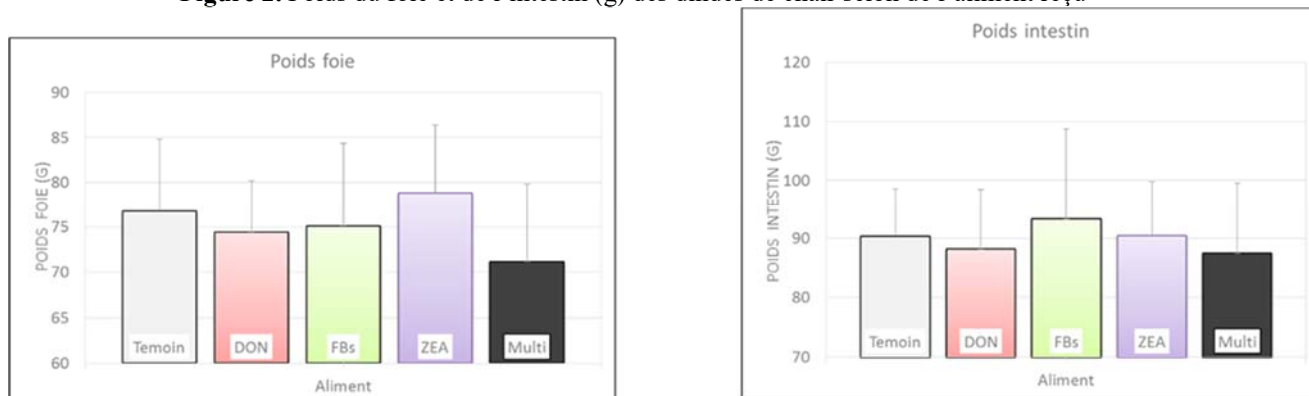


Figure 3. Monocytes plasmatiques (%) et ratio sphinganine / sphingosine hépatique calculés à partir des prélèvements des dindes de chair selon de l'aliment reçu

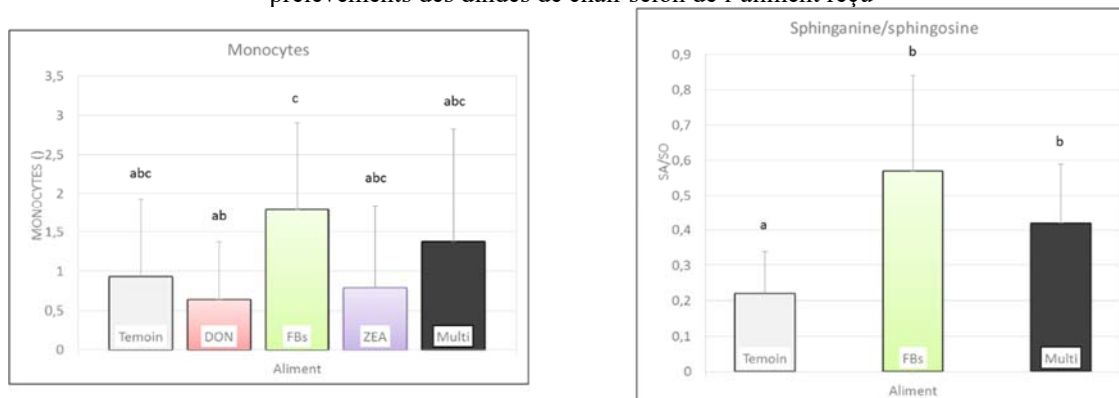


Tableau 1. Teneurs résiduelles en fumonisines B1(moyennes +/- écart-type, en µg FB1/kg) dans le foie et le muscle de dindes exposées 15 j de J56 à -J70.

Aliment/Matrice	Témoin	FBs	Multi-contaminé
Foie	<1	52,9 +/- 12,7	56,2 +/- 8,6
Muscle	<1	15,6 +/- 15,4	19,2 +/- 17,5

Tableau 2. Teneurs résiduelles en ZEA et alpha-zéaralénol (α-ZEA), libres et conjugués (moyennes +/- écart-type, en µg/kg) dans le foie de dindes exposées 15 j de J56 à J70.

Aliment/Foie	Témoin	ZEA	Multi-contaminé
ZEA libre	<0,2	0,21 +/- 0,21	0,22 +/- 0,24
α-ZEA libre	<0,2	0,53 +/- 0,46	0,8 +/- 0,93
ZEA conjugué	<0,2	0,98 +/- 0,57	1,34 +/- 1,32
α-ZEA conjugué	<0,2	1,70 +/- 0,91	1,35 +/- 1,04