2024. Journées Recherche Porcine, 56, 181-182. Publication sous Licence Creative Commons

Une association à surveiller : étude de l'interaction entre Isoflavones et Zéaralénone chez le porcelet

Barbara NOVAK (1), Dino GRGIC (2,3), Elisabeth VARGA (2), Doris MARKO (2), Laure ROUXEL (4), Barbara DOUPOVEC (1), Dian SCHATZMAYR (1)

(1) dsm-firmenich, Animal Nutrition and Health R&D Center, Tulln, Autriche
(2) Department of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Chemistry, University of Vienna, Autriche
(3) Doctoral School in Chemistry, University of Vienna, Autriche
(4) dsm-firmenich, ANH Nutritional Products, France

laure.rouxel@dsm.com

The troubling tandem: investigating the interaction of isoflavones and zearalenone on weaning piglets

Isoflavones (ISF) such as daidzein (DAI) and genistein (GEN) as well as their glycosides occur frequently in feed samples, mainly due to the increasing addition of soy. Due to the structural similarity of ISF with 17β-estradiol, their influence on endocrine activity in humans and animals is discussed and depends on the dose and exposure. Furthermore, ISF co-occur commonly with the *Fusarium* mycotoxin zearalenone (ZEN), which is known to interfere with both oestrogen receptors (ERα and Erβ) and thus have negative effects on the reproductive system. In this study, we investigated effects of an ISF-rich diet alone (targeted 20 mg/kg DAI and GEN plus 200 mg/kg glycosides), a ZEN-diet (targeted 0.9 mg/kg) and a combined diet (ISF+ZEN) on clinical effects in 40 female weaning piglets fed for 15 days. We also included one group receiving a specific ZEN-degrading enzyme (ENZ, 40 U/kg) to the ISF+ZEN group to assess whether the negative effects of ZEN were counteracted. As a control, a special feed mixture without soy was used. Dietary ZEN led to a significant increase in vulva area ($P = 0.0167$) and uterus weight ($P = 0.0051$) compared to those of the control diet. Also, the combination of ISF+ZEN significantly increased the vulva area ($P = 0.0101$) but resulted in an even higher uterus weight than ZEN alone ($P = 0.0004$). ISF alone had no effect on the parameters measured. When ENZ was added to the ISF+ZEN diet, no more clinical effects were observed. The investigation of synergistic effects of both compound groups on the reproductive system of animals, as well as the exploration of counterstrategies, holds significant interest due to the frequent co-occurrence in animal feed.

INTRODUCTION

Les isoflavones (ISF) sont des métabolites secondaires de plantes, caractérisées par une similarité structurelle et fonctionnelle avec l'hormone œstrogène 17β-estradiol (Grgic *et al.*, 2021), d'où leur classification en phytoœstrogènes. On les trouve en fortes concentrations dans le soja et le trèfle rouge, deux plantes couramment utilisées comme compléments alimentaires. Les principales isoflavones sont la daidzéine (DAI), la génistéine (GEN) et leurs glycosides, la daidzine et la génistine. En outre, des mycotoxines à activité œstrogénique bien décrite, telle que la zéaralénone (ZEN), sont retrouvées avec les ISF en alimentation animale (Grgic *et al.*, 2021).

Cette étude a pour objectif l'évaluation des effets endocriniens des ISF sur les paramètres cliniques de porcelets femelles, ainsi que leurs effets combinés possibles avec la ZEN. En parallèle, l'intérêt d'une enzyme recombinante purifiée capable de dégrader la ZEN en un métabolite non toxique et non œstrogène (ENZ) (Fruhauf *et al.*, 2019) a été mesuré.

Cet essai a été approuvé par l'autorité autrichienne d'éthique sous le numéro d'autorisation LF1-TVG-57/032-2022.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

Quarante porcelets femelles de génotype autrichien Ö-HYB-F1 [(Landrace x Large White) x Pietrain] (Age moyen ± écart-type : 27,55 ± 0,88 jours) ont été répartis en cinq groupes : Témoin, ZEN, ISF, ISF + ZEN et ISF + ZEN + ENZ (ZENzyme®, zéaralénone hydrolase recombinante purifiée, 40 U/kg) (Tableau 1 : détail des concentrations en ISF et ZEN, mesurées par LC-MS/MS).

Après cinq jours d'acclimatation, les animaux ont été nourris avec leur régime respectif pendant 15 jours. Les aliments ne contenaient pas de soja, remplacé par des protéines de pomme de terre, de la levure et de la poudre d'œuf comme sources de protéines. La longueur et la largeur de la vulve ont été mesurées à J8 et J15. A la fin de l'étude, les animaux ont été euthanasiés et l'utérus a été pesé.

1.2. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism (version 9.1.0, Boston, Massachusetts USA). Toutes les données étant normalement distribuées (test de Shapiro-Wilk, $P > 0,05$), une ANOVA à un facteur (test de comparaisons multiples de Dunnett) a été réalisée (*$P < 0,05$, **$P < 0,01$, ***$P < 0,001$).

Tableau 1 - Concentrations dans les aliments

Groupe	ZEN (mg/kg)	DAI (mg/kg)	GEN (mg/kg)	Daidzine (mg/kg)	Génistine (mg/kg)
Témoin	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
ZEN	1,013 ± 88	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
ISF	< LQ	25,0 ± 3	19,4 ± 2	126,6 ± 3	151,1 ± 10
ISF + ZEN	0,740 ± 68	25,6 ± 2	18,7 ± 4	125,2 ± 6	155,2 ± 7
ISF + ZEN + ENZ	0,643 ± 18	23,6 ± 2	12,3 ± 1	123,8 ± 9	159,4 ± 13

< LQ = inférieur aux limites de quantification. ZEN = zéaralenone, DAI = daidzéine, GEN = génistéine, Moyenne et écart-type, n = 3

2. RESULTATS & DISCUSSION

A J8 et J15, les largeurs et longueurs des vulves ont été mesurées. A J8, aucune différence significative n'est constatée. A J15, la surface de la vulve est significativement augmentée dans les groupes ZEN et ISF + ZEN (P = 0,0167 et P = 0,0101, respectivement) (Figure 1). Une réduction numérique de la surface de la vulve est observée dans le groupe ISF + ZEN + ENZ par rapport aux groupes ZEN et ISF + ZEN.

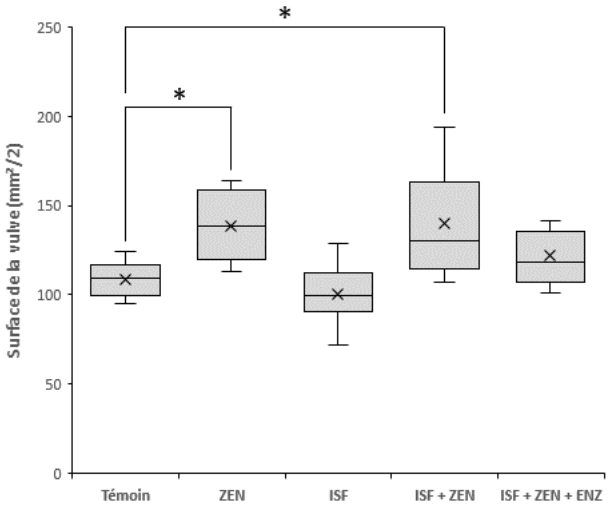

Figure 1 – Incidence des régimes respectifs sur la surface de la vulve (mm^2/2) en comparaison avec le Témoin à J15 (*P < 0,05)

Après euthanasie à J15, l'utérus a été retiré, pesé et son poids a été rapporté au poids corporel (PC) de chaque animal (Figure 2). La différence de poids de l'utérus entre le groupe Témoin et le groupe ISF + ZEN est plus significative (P = 0,0004) qu'entre le groupe Témoin et le groupe ZEN (P = 0,0051). Le régime ISF n'a induit aucun changement au cours de cet essai. En ajoutant ENZ au régime ISF + ZEN, aucun effet clinique n'a plus été constaté. On peut en conclure que l'enzyme a dégradé la mycotoxine ZEN et ainsi contrecarré ses effets négatifs.

Les impacts distincts de ZEN, ISF et ISF + ZEN pourraient être dus aux différentes affinités de ZEN et ISF pour les récepteurs d'œstrogènes ERα et ERβ, comme l'a mis en évidence une publication récente de Grgic *et al.* (2022).

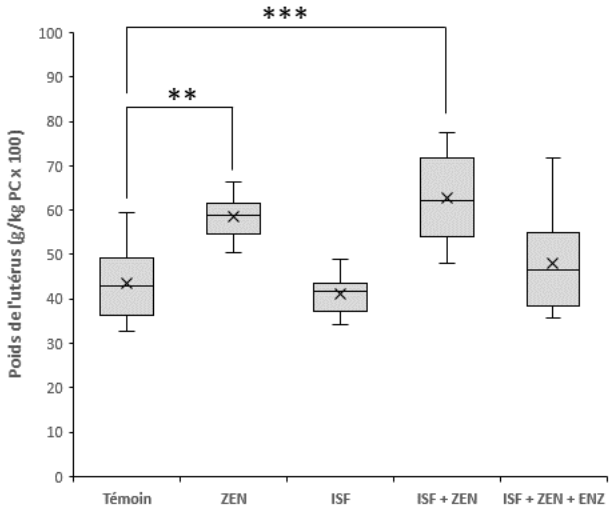

Figure 2 – Incidence des régimes respectifs sur le poids de l'utérus (g/kg PC * 100) en comparaison avec le Témoin à J15 (**P < 0,01, ***P < 0,001)

CONCLUSION

La co-occurrence de fortes concentrations d'ISF et de concentrations marquées de ZEN peut être retrouvée dans les échantillons d'aliments pour animaux. Il est donc pertinent d'étudier leurs effets combinés possibles.

La ZEN, à concentration élevée, a eu un effet significatif sur l'élargissement de la vulve et l'augmentation du poids de l'utérus. Les ISF seules n'ont pas eu d'effet. Des travaux complémentaires en cours doivent permettre de mieux appréhender les impacts sur les animaux de ZEN et ISF en co-contamination. Ceux-ci pourraient dépendre fortement de la dose d'ISF, de la durée d'exposition et de l'espèce (Grgic *et al.*, 2021). Dans notre étude, l'enzyme ENZ a pu contrecarrer tous les symptômes cliniques négatifs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fruhauf S., Novak B., Nagl V., Hackl M., Hartinger D., Rainer V., Labudova S., Adam G., Aleschko M., Moll W., Thamhesl M., Grenier B., 2019. Biotransformation of the mycotoxin ZENralenone to its metabolites hydrolyzed ZENralenone (HZEN) & decarboxylated hydrolyzed ZENralenone (DHZEN) diminishes its estrogenicity in vitro and in vivo. Toxins, 11, 481.
- Grgic D., Varga E., Novak B., Müller A., Marko D., 2021. Isoflavones in animals: Metabolism, effects in livestock & occurrence in feed. Toxins, 13, 836.
- Grgic D., Betschler A., Früholz R., Novak, B., Varga E., Marko D., 2022. Estrogenic in vitro evaluation of ZENralenone & its phase I and II metabolites in combination with isoflavones. Archiv. of Toxicol., 96, 3385–3402.