

Nouvelles données sur le devenir et les effets des fusariotoxines chez le porc

New data concerning the fate and the effects of fusariotoxins in pigs

Oswald ; Isabelle P. ; Loiseau ; Nicolas ; Viadère ; Jean-Luc ; Pinton ; Philippe ; Galtier ; Pierre

INRA – U.R. INRA 66 – Pharmacologie-Toxicologie, 180 chemin de tournefeuille, B.P. n° 3, F-33931 Toulouse Cedex – mël : isabelle.oswald@toulouse.inra.fr

Résumé

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Elles sont produites sur une large variété de matières premières avant, pendant et après la récolte. Très résistantes aux traitements technologiques, les mycotoxines se retrouvent dans les denrées destinées à l'homme ou à l'animal. En Europe, les conditions climatiques sont propices au développement sur les céréales au champ, de souches de *Fusarium* susceptibles de produire du déoxynivalénol (DON) ou de la Fumonisine B₁ (FB1). Le porc est très sensible à ces deux mycotoxines. De plus, son alimentation riche en céréales l'expose plus particulièrement à ces toxines. Le but de ce travail était de compléter les connaissances sur ces deux toxines de *Fusarium* à la fois au niveau de leur devenir et de leurs effets chez le porc. Les résultats obtenus montrent que le DON affecte la réponse immunitaire acquise et innée des porcelets. En effet, l'ingestion pendant 9 semaines d'aliment contaminé (2000 µg DON/Kg) par des porcelets immunisés avec de l'ovalbumine entraîne une augmentation des immunoglobulines de type A totale et spécifique et modifie la prolifération cellulaire après stimulation par l'antigène vaccinal. Ceci laisse penser que cette toxine pourrait aussi affecter le système immunitaire des porcs lors d'une vaccination contre un agent pathogène. Des études *in vitro* sur la lignée de cellules épithéliales intestinales porcines IPEC et *ex vivo* sur des explants d'intestins montés dans des chambres d'Ussing montrent que le DON diminue la fonction de barrière de

l'épithélium. En effet, on observe un passage accru de macromolécules et de bactéries à travers des épithéliums traités. Ceci est associé avec une modulation spécifique de deux protéines de jonction serrées les claudines 3 et 4. Concernant la FB1, les résultats obtenus montrent que dans des conditions proches des concentrations *in vivo*, cette toxine pouvait être métabolisé d'autant plus intensément que les concentrations étaient faibles. L'étude de la toxicité des métabolites s'avère en conséquence nécessaire.

Mots clés : *Fusarium* spp., deoxynivalenol, fumonisine, devenir, effet, porc.

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi belonging mainly to the genus Aspergillus, Penicillium and Fusarium. They are produced on a wide variety of raw materials before, during and after harvest. Very resistant to technological treatments, mycotoxins could be found in foodstuffs intended to man and animal. In Europe, the climatic conditions are favourable to the development on cereal in the field, of Fusarium susceptible to produce deoxynivalenol (DON) or fumonisin B1 (FB1). Pig is an animal species very sensitive to these mycotoxins both. Furthermore, its cereal rich diet makes it is particularly exposed to these toxins. The purpose of this work was to complete our knowledge on these two Fusarium toxins concerning both their effect and their metabolism. We showed that DON affects both the acquired and innate immune response of piglets. Indeed, the ingestion during 9 weeks of feed contaminated with 2000 µg DON/kg to piglets immunized with ovalbumin induced an increase of total and ovalbumin specific immunoglobulins of type A total and modify the cellular proliferation of lymphocytes after stimulation by the vaccinal antigen. This suggests that this toxin could also affect the immune system of the pigs during a vaccination against a pathogenic microorganism. Studies performed both in vitro, on the porcine intestinal epithelial cell line IPEC, and ex vivo on intestinal explants mounted in Ussing chambers showed that the DON decreases the barrier function of the epithelium. Indeed we observed a higher passage of macromolecules and bacteria through epithelium. This was associated with a specific modulation of two tight junction proteins, claudins 3 and 4. Concerning FB1, we showed that this toxin is highly metabolized by porcine liver microsomes at low concentrations, comparable with the in vivo concentration. The toxicity of the metabolites produced needs to be addressed.

Keywords: Fusarium spp., deoxynivalenol, fumonisin, fate, effect, swine.

Introduction

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant principalement aux genres *Aspergillus*, *Penicilium* et *Fusarium*. Elles sont produites sur une large variété de matières premières avant, pendant et après la récolte. Très résistantes aux traitements technologiques, les mycotoxines se retrouvent dans les denrées destinées à l'homme ou à l'animal. Les mycotoxines offrent un large spectre d'effets toxiques. Les syndromes dus à l'ingestion de doses fortes ou moyennes de mycotoxines sont bien caractérisés et vont de la mortalité aiguë à une croissance réduite ou des problèmes de reproduction. La consommation de quantités moindres de toxines peut conduire à une altération de la réponse immunitaire et diminuer la résistance aux maladies infectieuses.

En Europe, les conditions climatiques sont propices au développement sur les céréales au champ, de souches de *Fusarium* susceptibles de produire du déoxynivalénol (DON) ou de la Fumonisine B₁ (FB1). La FB1, principalement produite par *F. verticilloides*, est la plus étudiée d'un groupe de toxines de structure voisine des sphingolipides (Riley *et al.*, 1998). Son inhibition vis à vis de la céramide synthase provoque une augmentation disproportionnée de sphinganine intracellulaire libre. La symptomatologie varie d'une espèce à l'autre, les plus sensibles étant le cheval qui développe une leuco-encéphalomalacie et le porc atteint d'œdème pulmonaire. Le déoxynivalénol (DON), principalement produit par *F. graminearum*, *F. culmorum*, fait partie du groupe B de la famille des trichothécènes. Chez le porc, à des concentrations élevées le DON provoque refus alimentaire et vomissements. Aux faibles concentrations, plusieurs études réalisées sur des porcelets ou sur des porcs en croissance ont montré que le DON peut diminuer la consommation alimentaire et altérer la réponse immunitaire systémique (Etienne, 2007).

Le porc est une espèce d'élevage très sensible à ces deux mycotoxines. De plus, son alimentation riche en céréales a pour conséquence qu'il est particulièrement exposé à ces toxines. Le but de ce travail était de compléter les connaissances sur ces deux toxines de *Fusarium* à la fois au niveau de leur devenir et de leurs effets. Les connaissances dans ces deux domaines différant d'une toxine à l'autre, les recherches ont été centrées sur le devenir de la FB1 et les effets du DON, en particulier sur la réponse immunitaire innée.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Animaux, aliment et protocole de vaccination

Des porcelets mâles arrivés au Laboratoire le jour du sevrage ont été acclimatés pendant 7 jours puis alimentés à volonté avec les différents aliments fabriqués par ARVALIS-Institut du Végétal.

- ✓ 10 animaux vaccinés ont reçu l'aliment contrôle,

Colloque Fusariotoxines des Céréales – Arcachon - 11–13 septembre 2007
www.symposcience.org

- ✓ 10 animaux vaccinés ont reçu l'aliment contaminé (2500 µg DON/kg d'aliment),
- ✓ 4 animaux non vaccinés ont reçu l'aliment contrôle et ont été des témoins internes de l'efficacité de la vaccination.

Les animaux ont reçu 2 puis 1 mg d'ovalbumine dilué dans de l'adjuvant incomplet de Freund à 4 et 14 jours après le début de l'expérience.

1.2. Prélèvements et dosages

Des prélèvements hebdomadaires de sang ont été effectués durant 9 semaines. La prolifération lymphocytaire a été mesurée sur le sang dilué au 1/15 dans du milieu de culture comme précédemment décrit (Pinton *et al.*, 2008). Les cellules ont été incubées en présence de mitogène (concanavaline A, 2 µg/mL) ou d'antigène vaccinal (ovalbumine, 5 µg/mL) pendant 72 heures. Durant les dernières 24 heures, les cultures ont été pulsées avec de la thymidine tritiée (0.5 µ Ci /puits) avant d'être récoltée sur des filtres Watman. La quantité de thymidine incorporée dans l'ADN des cellules en division a été mesurée avec un compteur bêta.

La concentration totale en immunoglobulines a été déterminée par ELISA dans les plasmas dilués selon le protocole du fournisseur (Béthyl, Interchim, Montluçon, France). La concentration en immunoglobuline anti-ovalbumine a été déterminée par ELISA dans les plasmas dilués sur des plaques préalablement sensibilisées avec de l'ovalbumine.

1.3. Culture cellulaire et explants intestinaux

La lignée de cellules IPEC-1 est une lignée de cellules épithéliales intestinales porcines obtenue à partir de l'intestin grêle d'un porcelet nouveau-né. Les cellules sont cultivées comme précédemment décrit (Bouhet *et al.*, 2004).

Des porcs nourris avec un aliment contrôle ont été abattus par exsanguination après électronarcose. Des fragments de jéjunum d'environ 10 centimètres ont été prélevés et maintenus à 4°C dans du tampon de Krebs-Henseleit (Sigma). Après incision longitudinale, les couches séreuses et musculaires ont été retirées et la couche épithéliale a été montée dans des chambres d'Ussing de 0.5 cm². Ces tissus ont été incubés à 38°C dans 5 ml tampon de Krebs-Henseleit sous atmosphère de carbogène (95% O₂, 5% CO₂). Les tissus ont été équilibrés pendant 10 minutes avant l'addition du DON (Sigma) dans le compartiment muqueux comme précédemment décrit (Pinton *et al.*, 2009).

1.4. Mesure de la résistance électrique transépithéliale

Les cellules ont été traitées avec du DON et l'intégrité des jonctions serrées a été évaluée pendant 13 jours en mesurant la résistance électrique trans-épithéliale à l'aide d'un ohm-mètre (Millicell, Saint-Quentin Yvelines, France). Les valeurs expérimentales de TEER sont exprimées en kOhms.

1.5. Perméabilité transépithéliale au dextran

La perméabilité épithéliale au dextran a été évaluée *in vitro* sur les cellules IPEC-1 cultivées sur filtre et *ex vivo* sur des fragments d'intestin montés dans des chambres d'Ussing. Les monocouches de cellules IPEC-1 ont étéensemencées et différenciées sur des filtres avec une porosité de 0.4 µm. Elles ont été traitées avec différentes concentrations de DON pendant 48 heures avant d'ajouter 5µL de dextran-FITC (22 mg/ml) dans le compartiment apical. Après 1 heure, des aliquots ont été prélevés dans le compartiment basal et l'intensité de fluorescence a été mesurée. Les chambres d'Ussing ont été préparées comme décrit ci-dessus. Après 10 minutes d'équilibration, différentes concentrations de DON et 500 µL de dextran-FITC (22 mg/ml) ont été ajoutés du côté muqueux. A différents temps, des aliquots ont été prélevés du côté séreux et la perméabilité intestinale a été évaluée.

1.6. Translocation bactérienne

Les cellules IPEC-1ensemencées dans des filtres avec des pores de 3 µm ont été différenciées comme précédemment décrit. Après 24 heures d'exposition au DON, les cellules ont été mises en présence de milieu sans antibiotique. Après 24 heures d'incubation, 1 x 10⁷ *Escherichia coli* pathogène ont été inoculés dans le compartiment apical. A différents temps, 100 µl de milieu ont été prélevés dans le compartiment basal, dilués au 1/2 dans du PBS etensemencé sur des boites d'Agar. Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies bactériennes ont été comptées.

1.7. Induction des Cytochromes P450 et préparation des microsomes de foie

Des porcelets mâles large White (5-9 kilos) ont été traités avec de la β-naphtoflavone à 100 mg/kg i.p. dans de l'huile de maïs pendant 5 jours, ou du phénobarbital à 50 mg/kg p.o. en solution sucrée pendant 5 jours, ou de la rifampicine à 50 mg/kg p.o. sous formulation Rifadin pendant 5 jours, ou avec du Clofibrate à 200 mg/kg i.p. pendant cinq jours. Les porcelets ont été sacrifiés une nuit après le dernier traitement.

Les microsomes ont été préparés à partir de 50 g de foie de porc selon une méthode analogue à la préparation des microsomes de foie de rats décrits par Schenkman *et al.*, 1998. Ils sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

1.8. Activités enzymatiques et analyse par Western Blot

Les contenus en cytochromes P450 (CYP) et B5 sont déterminés à partir de la différence d'absorption UV entre un échantillon microsomal réduit avec du dithionite de sodium et un échantillon analogue saturé en monoxyde de carbone (Omura *et al.*, 1964). Les activités éthoxyrésorufine, méthoxyrésorufine et pentoxyrésorufine déalkylases (respectivement EROD, MROD et PROD) ont été déterminées par spectrofluorimétrie selon la méthode de Lake (1987). Les activités d'hydroxylation de la testostérone et de l'acide laurique ont été déterminées par HPLC en utilisant respectivement une détection UV à 247nm et une détection radioactive.

Les sous-familles CYP1A, CYP2C, CYP3A et CYP4A ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8,5% en présence de SDS. Afin de comparer les différents types d'induction, la quantité déposée de CYP a été standardisée à 5 pmoles par ligne. Les protéines microsomaux sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose. La révélation est réalisée en utilisant une technologie de chimioluminescence (ECL kit, Amersham) avec un anticorps primaire anti-P450 et un anticorps secondaire associé à la peroxydase. La proportion relative de chaque forme de cytochromes P450 a été estimée par densitométrie en utilisant un Omnidia XRS 12 CX Bioimage Scanner (Roissy, France). L'intensité des bandes a été normalisée sur les échantillons témoins.

1. 9. Réceptologie UV-visible différentielle

La réceptologie de la FB1 vis-à-vis des cytochromes P450 a été étudiée par spectroscopie différentielle en utilisant une solution de cytochromes P450 à 2 μ M dans un tampon phosphate 100mM (pH 7,4), provenant des microsomes de foie de porc. La solution est équitablement divisée en deux volumes de 500 μ L disposés dans des cuvettes spectrophotométriques. Après enregistrement de la ligne de base, des aliquotes de 0,5 à 1 μ L de FB1 sont ajoutées à la cuvette échantillon, les mêmes volumes de solvant sont ajoutés dans la cuvette référence. Le spectre différentiel est enregistré entre 360 à 440 nm à température ambiante en utilisant un spectrophotomètre UVIKON 922 (KONTRON). Le K_s (constante de dissociation estimée) et le ΔDO_{max} ont été estimés par régression linéaire à partir de la représentation en double inverse ($1/[FB1]$; $1/DO$), en utilisant le logiciel Microsoft Excel.

1.10. Incubations microsomaux

Le métabolisme de la FB1, à différentes concentrations, a été étudié à 37°C dans un tampon phosphate 100mM (pH 7,4) en présence de 2 μ M de cytochromes P450 et de NADPH (5mg/mL). Les incubations ont été stoppées après 30 minutes, en ajoutant un volume équivalent d'acétonitrile. Les protéines sont précipitées par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Les échantillons sont évaporés sous flux d'air comprimé et repris dans 100 μ L d'un mélange eau-acétonitrile (8:2). Les analyses sont effectuées par HPLC-MS sur une colonne C18 (Luna 5 μ , 150 x 2,1mm). La séparation est réalisée à 200 μ l/min en utilisant un éluant A : acide formique 0,1% et un éluant B : Acétonitrile, en mode gradient selon la séquence suivante : 0-10 min 80% A ; 15-25 min 60% A ; 30-35 min 40% A et 40-60 min 80% A. la détection est réalisée en ionisation par électrospray négatif. Dans ces conditions chromatographiques, le temps de rétention de la fumonisine B₁ est de 22,9 minutes.

2. Résultats et discussion

2.1. Effet du DON sur la réponse immunitaire acquise

Les effets de la présence de DON (2 500 μ g/kg d'aliment) dans le régime alimentaire ont été analysés de la réponse immunitaire cellulaire et humorale des porcelets lors d'une

vaccination expérimentale. La consommation d'aliment contaminé par le DON n'a pas affecté significativement la vitesse de croissance des animaux ni leur hémogramme. En revanche, l'ingestion de DON a modifié la réponse immunitaire humorale et cellulaire des animaux.

2.1.1. Réponse à médiation cellulaire.

L'ingestion d'aliment contaminé par le DON n'a pas d'effet sur la prolifération des lymphocytes lors d'une stimulation mitogénique. Ces résultats confirment des données obtenues chez des porcelets ou des porcs en croissance ingérant des aliments contaminés par 3000 à 4700 µg DON/kg d'aliment (Øvernes et al., 1997; Rotter et al., 1994).

En revanche, l'ingestion de cette mycotoxine modifie la réponse proliférative des lymphocytes vis-à-vis de l'antigène vaccinal. Chez les animaux ayant ingéré la toxine, on observe aussitôt après la vaccination une prolifération supérieure mais cette réponse diminue rapidement pour devenir en fin d'expérimentation inférieure à la réponse observée chez les animaux recevant l'aliment non contaminé. Cet effet bi-phasique est à rapprocher des données obtenues *in vitro* et *in vivo* chez la souris pour laquelle de faibles doses s'avèrent immunostimulatrices et provoquent l'induction de gènes codant pour des cytokines tandis que les fortes doses entraînent une apoptose des macrophages ou des lymphocytes T et B (Pestka et al., 2004).

2.1.2. Réponse à médiation humorale.

La réponse humorale non spécifique a été étudiée et une augmentation de la concentration plasmatique en IgA chez les animaux ingérant du DON a été mise en évidence (Figure 1). L'augmentation de la teneur en IgA sérique avec l'ingestion d'un aliment contaminé avec du DON est en accord avec ce qui a été observé dans d'autres essais menés sur porcs (Etienne 2007). Cette augmentation de la teneur en IgA sérique est aussi en accord avec les travaux chez la souris recevant pendant 8 semaines un aliment contenant 25000 µg de DON/kg. L'élévation du taux d'IgA reste visible même après arrêt de l'exposition à la toxine lorsque celle-ci a été administrée pendant 8 semaines. Le mécanisme qui conduit, après ingestion de DON, à la production d'IgA par certains lymphocytes B passe par la production de cytokines telles que IL-2, IL-5 et IL-6, capables d'activer la production d'IgA (Pestka et Smolinski, 2005).

En ce qui concerne la réponse vaccinale, on observe également une augmentation de la réponse en IgA dirigée contre l'ovalbumine (Figure 1) mais également celle des IgG. Chez le porc, les études précédentes se sont limitées à l'analyse des effets de l'ingestion de DON sur la réponse vaccinale globale, qui est majoritairement le fait des IgG, et ne décrivent pas d'effet immunostimulant du DON (Øvernes et al., 1997; Rotter et al., 1994). Ce travail constitue la première étude montrant un effet du DON sur la production spécifique d'IgA.

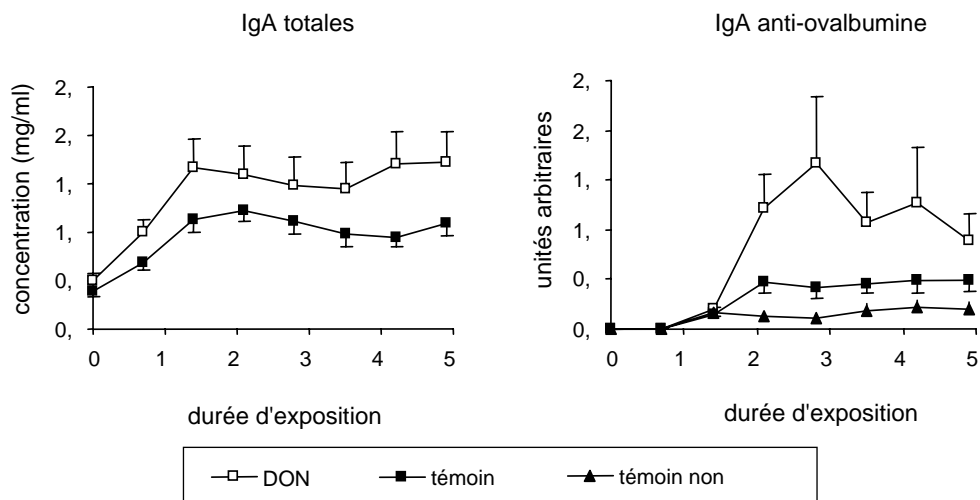


Figure 1 : Effet du DON sur la réponse immunitaire (IgA totales et IgA spécifiques de l'antigène vaccinal)

En conclusion, le DON présent dans l'alimentation à une teneur moyenne pendant une longue période affecte le système immunitaire des porcs lors d'une réponse 'vaccinale' à l'ovalbumine, ce qui laisse penser que cette toxine pourrait aussi affecter le système immunitaire des porcs lors d'une réponse à une vaccination contre un agent pathogène.

2.2. Effet du DON sur la fonction de barrière et la réponse immunitaire innée

2.2.1. Passage de macromolécules

Les effets du DON ont tout d'abord été étudiés ex vivo sur des fragments d'intestin de porc placés dans des chambres d'Ussing. L'ajout de DON dans le compartiment muqueux augmente le passage du Dextran-FITC, une macromolécule témoin (Figure 2). Cette augmentation est fonction du temps d'incubation en présence de DON et de la concentration en toxine.

Afin d'analyser plus finement le mécanisme impliqué, les effets du DON ont été étudiés in vitro sur une lignée de cellules épithéliales intestinales porcines, la lignée IPEC-1, cultivée sur des filtres poreux. Comme montré précédemment ex vivo, lorsque du DON est ajouté dans la partie apicale, le passage du Dextran-FITC est augmenté de façon dose-dépendante à travers la monocouche de cellules épithéliales.

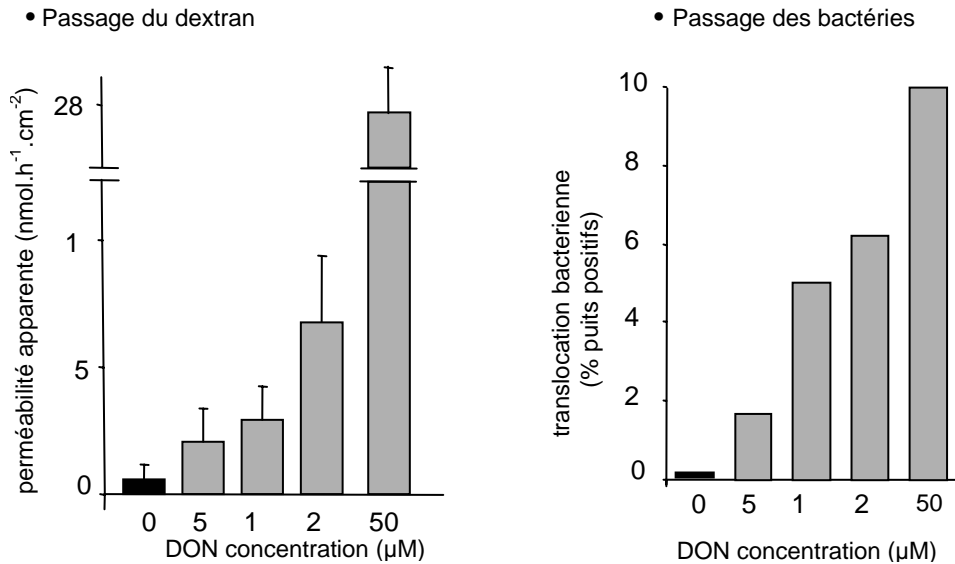


Figure : Effet du DON sur la fonction de barrière de l'épithélium intestinal : passage d'une macromolécule (dextran) ou de bactéries

2.2.2. Résistance transépithéliale

Les effets de la toxine ont été étudiés sur la résistance électrique transépithéliale, indicateur de l'intégrité de la monocouche d'IPEC-1. Après différenciation, les cellules ont été traitées pendant la durée de l'étude et les mesures électrophysiologiques ont été réalisées à intervalles réguliers. Les résultats montrent un effet de la toxine proportionnel à la dose et au temps d'incubation, sur la perturbation de l'intégrité de la monocouche de cellules épithéliales intestinales.

2.2.3. Translocation bactérienne

Afin de déterminer les effets sur la translocation bactérienne à travers la monocouche épithéliale, les cellules épithéliales ont été traitées pendant 48 heures avec des doses croissantes de FB1. Des *Escherichia coli* ont été ajoutés au compartiment apical du tapis cellulaire. A différents temps d'incubation, du milieu de culture a été prélevé dans le pôle basal afin de déterminer si des bactéries avaient transloqué du pôle apical vers le pôle basal. Le traitement de la monocouche augmente la translocation bactérienne de façon dépendante de la dose et du temps (Figure 2).

2.2.4. Expression des protéines de jonction serrées

Les effets du DON sur l'expression de quatre protéines de jonction ont été également analysés par immunocytochimie. Le traitement des cellules par le DON ne modifie pas

l'expression de l'occludine et de ZO-1. En revanche, cette mycotoxine diminue l'expression des deux claudines testées, la claudine 3 et la claudine 4.

En conclusion, toutes ces études démontrent que le déoxynivalénol diminue la fonction de barrière des cellules intestinales et augmente la translocation bactérienne probablement à la suite d'une altération des protéines de jonction serrées. Si les effets du DON sur la résistance transépithéliale ont déjà été décrits sur des cellules tumorales humaines (Sergent et al., 2006), notre étude est la première à décrire cet effet sur ces cellules épithéliales intestinales non tumorales telles que les cellules IPEC. Les effets de deux mycotoxines, l'ochratoxine et la fumonisine sur la fonction de barrière de l'épithélium intestinal et/ou l'expression des protéines de jonction serrées ont déjà été documentés (Bouhet et al., 2004 ; Loiseau et al., 2007 ; McLaughlin et al., 2004). Notre étude montre que le DON agit également sur ces deux paramètres.

2.3. Métabolisme de la Fumonisine B1 chez le porc

2.3.1 Interaction des cytochromes P450 totaux et de la fumonisine B1

La première étude a porté sur l'analyse de l'interaction entre les cytochromes P450 et la FB1 par spectrophotométrie UV visible (Figure 3). Elle a permis de démontrer que seules les préparations protéiques issues de porcs traités par le clofibrate présentaient une interaction caractérisée entre la mycotoxine et l'apoprotéine du cytochrome P450 4A (spectre de type 1) et ceci avec une affinité apparente de l'ordre de 10 μ M.

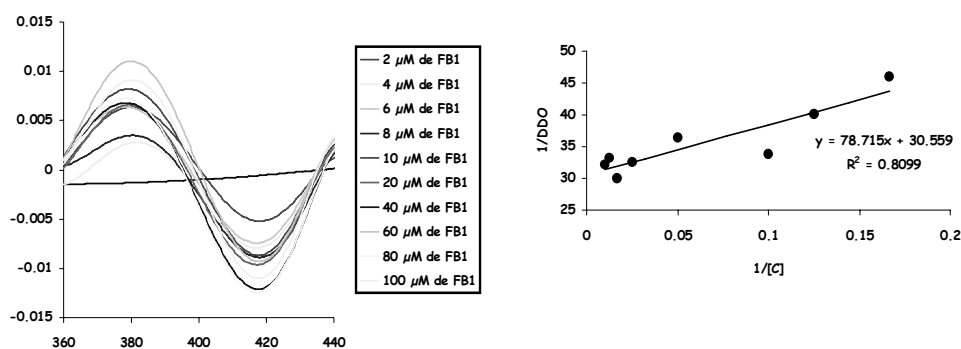


Figure : Spectre d'interaction de la fumonisine B₁ et de microsomes hépatiques de porc induits au clofibrate (figure de gauche) et représentation en double inverse de cette interaction.

2.3.2. Métabolisme hépatique de la fumonisine B1

Les effets toxicologiques de la FB1 peuvent aussi être expliqués par la formation d'un ou plusieurs métabolites. L'analyse par LC-MS des surnageants d'une série d'études de

biotransformation microsomale de la FB1 par les diverses suspensions protéiques induites, a permis de révéler l'existence de deux métabolites de la toxine :

- le métabolite 1 correspond à un clivage de l'extrémité alpha amino-alcool de la chaîne carbonée de la toxine équivalente à celui observé lors du métabolisme du cholestérol par le CYP11A1.

- le métabolite 2 est issu d'une hydroxylation aliphatique de la chaîne carbonée de la toxine.

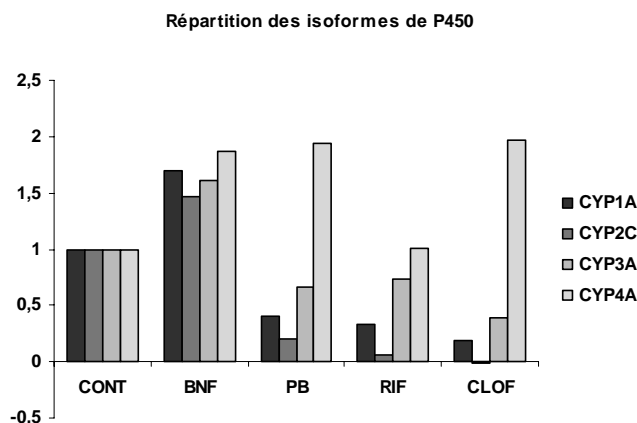


Figure 4 : Proportion relative des sous-familles de cytochrome P450 présentes dans les microsomes hépatiques, de porcs témoins (CONT) ou traités à la β naphtoflavone (BNF), au phénobarbital (PB), à la rifampicine (RIF) ou au clofibrate (CLOF).

Le taux de métabolisme relativement faible (de l'ordre de 0,3%) n'a pas permis d'identifier clairement les cytochromes P450 responsables de la formation de chacun de ces métabolites. Néanmoins, les taux de chacun des deux métabolites formés en fonction des types de suspensions microsomales utilisés (Tableau 1) et la comparaison avec la répartition des sous-familles de P450 présentes dans ces mêmes suspensions (Figure 4), amènent à émettre l'hypothèse que les P4501A et P4504A soient respectivement impliqués dans la formation des métabolites 1 et 2.

Tableau 1. Taux de métabolites formés en fonction des diverses suspensions protéiques utilisées.

	Témoin	β -naphtoflavone	phénobarbital	rifampicine	Clofibrate
métabolite 1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
métabolite 2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,3

2.3.3. Interaction de la FB1 avec les activités des P4501A, 2A, 3A et 4A

L'implication de ces isoformes a été confirmée par la réalisation d'expériences de métabolisme compétitif de substrats spécifiques de l'une ou l'autre de ces isoformes en présence de FB1. L'influence de la présence de FB1 lors de la mesure de l'activité EROD (P450-1A) a été testée dans les suspensions microsomaux issues d'un traitement de porcs à la β -naphthoflavone. FB1 interagit avec l'activité EROD et on peut en conclure que la FB1 a une action directe sur la sous-famille P450-1A et plus vraisemblablement l'isoforme 1A1 de ces cytochromes P450.

L'interaction de la FB1 avec les activités PROD et testostérone 6 β -hydroxylase spécifiques respectivement des P450 2B et 3A a été également évaluée. Aucun effet de compétition n'a été observé, prouvant ainsi l'absence d'interaction avec les sous-familles respectives 2B et 3A.

L'interaction de la FB1 avec l'activité d'hydroxylation de l'acide laurique, gouvernée par les cytochromes P450-4A, a été démontrée (Figure 5). Considérant la représentation Lineweaver-Burk, cette interaction semble correspondre à une activation mixte de l'activité du CYP4A.

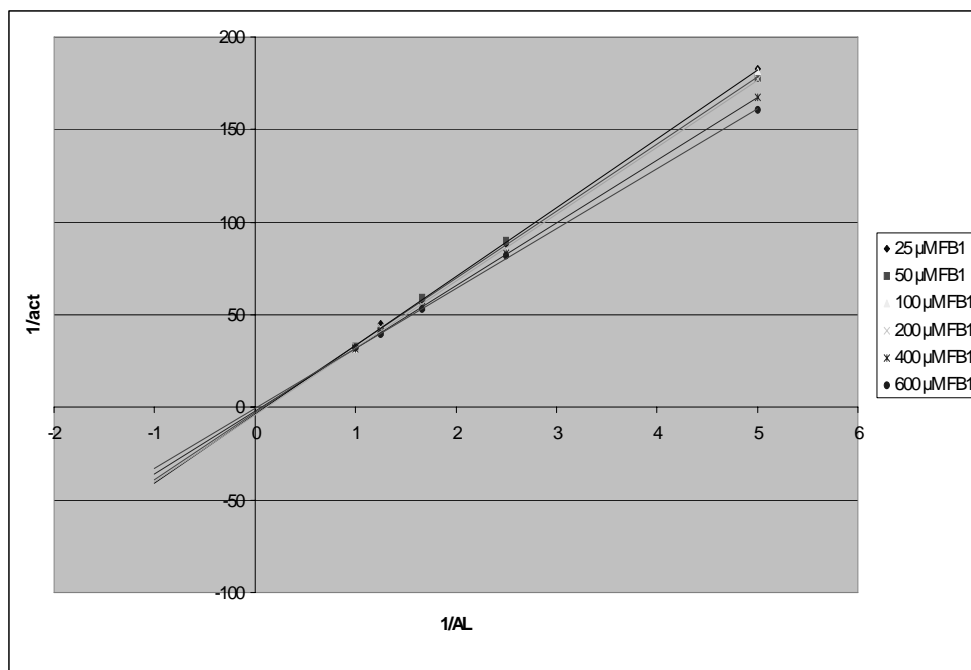


Figure 5. Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la FB1 sur l'activité d'hydroxylation de l'acide laurique sur des microsomes de foie provenant de porc traité au clofibrate.

2.3.4. Réévaluation du métabolisme hépatique de la fumonisine B1 à faible dose.

La première phase de l'étude du devenir métabolique de FB1 a été réalisée dans des conditions classiques à partir d'une forte concentration de FB1 (200 μ M). Cette étude a permis d'identifier la production de deux métabolites correspondant respectivement :

- au clivage homolytique de la tête polaire ($m/z = 679.5$) de la FB1 ($m/z = 722$) et
- à la mono-oxygénation ($m/z = 738$) de la chaîne carbonée de cette même mycotoxine.

Ce métabolisme correspond à 0,3-0,5% de biotransformation.

Une concentration sanguine de 200 μ M, correspondrait à l'équivalent de 144,2 mg de FB1 par litre de sang. L'absorption intestinale étant de 3 à 5 %, cette dose équivaut à une contamination de l'ordre de 288 mg/kg de poids vif, c'est-à-dire à une contamination possible mais d'un niveau exceptionnellement élevé.

Le métabolisme a été étudié dans un second temps à partir d'une concentration de l'ordre de 10 μ M et de 2 μ M de FB1, soit respectivement des contaminations de l'ordre de 14,4 mg/kg poids vif et de 2,88 mg/kg poids vif. Dans ces conditions, on constate que le métabolisme atteint respectivement 10% à 10 μ M et 50% à 2 μ M. Les principaux métabolites observés correspondent à une succession de mono-oxygénations et déshydratations multiples (Figure 6).

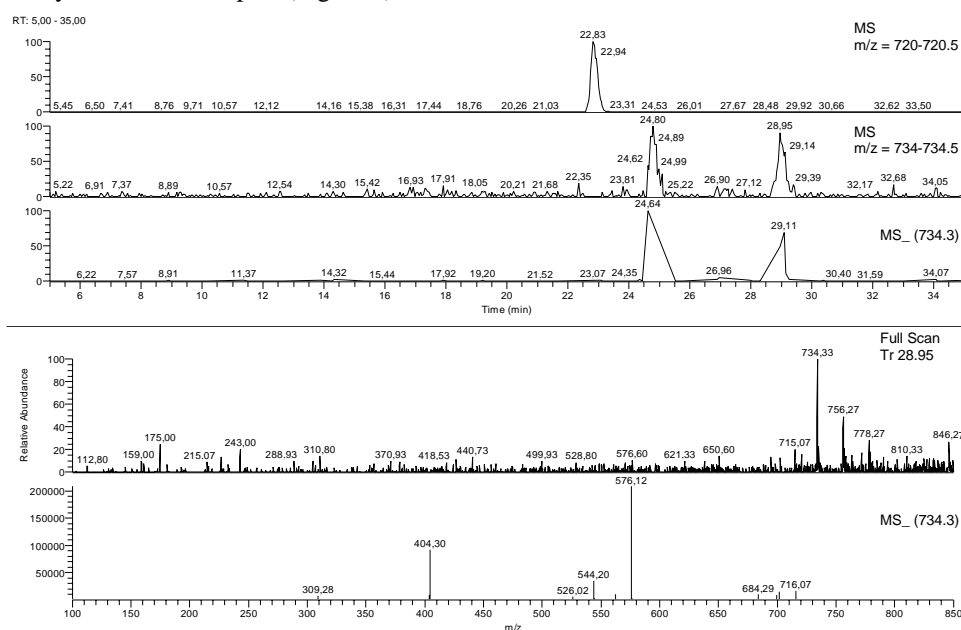


Figure 6 : Extraction des profils de masse et des spectres de masse de métabolites de la Fumonisine B1. Les profils extraits au rapport m/z : 720,3 et 734,3 correspondent respectivement à la fumonisine B1 et aux principaux métabolites déhydro-hydroxy-fumonisine B1. Le spectre de masse et de fragmentation des métabolites à 24.8 min et 28.95 min sont strictement identiques.

En conclusion, concernant la Fumonisine B1, nous avons montré que dans des conditions proches des concentrations *in vivo*, cette toxine pouvait être métabolisé d'autant plus intensément que les concentrations étaient faibles. Aussi, la question qui se pose actuellement concerne la toxicité de ces métabolites.

3. Conclusion

Les travaux ont cherché à déterminer le devenir et les effets des fusariotoxines chez le porc. Ils ont été menés dans deux directions : analyse des effets du DON sur la réponse immunitaire systémique et locale, analyse du métabolisme de la FB1.

Les résultats obtenus montrent que l'ingestion d'aliment contaminé par le DON affecte la réponse vaccinale des animaux. Ils montrent aussi que cette mycotoxine diminue la fonction de barrière de l'épithélium. Concernant le métabolisme de la FB1, les données présentées montrent que cette toxine est métabolisée d'autant plus intensément que les concentrations étaient faibles. La question qui se pose actuellement concerne la toxicité des métabolites formés.

Remerciements

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de L'innovation (Réseau de recherche et d'innovation technologiques Alimentation Référence Europe).

Références bibliographiques

- Bouhet S., Hourcade E., Loiseau N., Fikri A., Martinez S., Roselli M., Galtier P., Mengheri E., Oswald I.P. 2004. The mycotoxin, fumonisin B₁ alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 77: 165-171.
- Etienne M., 2007. Effets biologiques et physiologiques d'une mycotoxine, le déoxynivalénol (DON), chez le porc. *Journées Rech. Porcine.* 39: 407-418.
- Lake B.G., 1987. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: Snell, K., Mullock, B., *Biochemical Toxicology*. IRL Press, Oxford, UK, pp. 183-215.
- Leung L.W., Contreras R.G., Flores-Maldonado C., Cerejido M., Rodriguez-Boulan E. 2003. Inhibitors of glycosphingolipid biosynthesis reduce transepithelial electrical resistance in MDCK I and FRT cells *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284: C1021–C1030.
- Loiseau N., Debrauwer L., Sambou T., Bouhet S., Miller J.D., Martin P., Viadère J.L., Pinton P., Puel O., Pineau T., Tulliez J., Galtier P., Oswald I. P. 2007. Fumonisin B1 Exposure and its Selective Effects on Porcine Jejunal Segment: Sphingolipids, Glycolipids and Transepithelial Passage disturbance. *Biochem. Pharmacol.* 74: 144-152.

- McLaughlin J., Padfield P.J., Burt J.P.H., O'Neill C.A. 2004 Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:1412-1417.
- Omura T., Sato R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
- Øvernes G., Matre T., Sivertsen T., Larsen H. J., Langseth W., Reitan L. J., Jansen J. H., 1997. Effects of diets with graded levels of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on immune response in growing pigs. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 44: 539-550.
- Pestka J.J., Smolinski, A.T. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 8: 39-69.
- Pinton P., Accensi F., Beauchamp E., Cossalter A.M., Callu P., Grosjean F., Oswald I.P. 2008. Ingestion of Deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol. letters*. 177: 215-222.
- Pinton P., Nougayrede J.P., del Rio J.C., Moreno C., Marin D., Ferrier L., Bracarense A.P., Kolf-Clauw M., Oswald I.P. 2009. The food contaminant, deoxynivalenol, decreases intestinal barrier function and reduces claudin expression. *Tox. Appl. Pharmacol.* 237: 41-48.
- Rotter B. A., Thompson B. K., Lessard M., Trenholm H. L., Tryphonas H., 1994. Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23: 117-124.
- Schenkman, J.B., Jansson, I., 1998. Isolation and Purification of Constitutive Forms of Microsomal Cytochrome P450, vol.107, Phillips I.R., Shephard E.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, pp.58-59.
- Sergent T, Parys M., Garsou S., Pussemier L, Schneider Y.J., Larondelle Y. 2006. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Letters* 164: 167-176.