

**TOXICOCINETIQUE DE LA FUMONISINE B1 ADMINISTREE PAR VOIE ORALE
CHEZ LA DINDE EN L'ABSENCE ET EN LA PRESENCE D'UNE EXPOSITION
PREALABLE A CETTE TOXINE DANS L'ALIMENT PENDANT UNE PERIODE
DE 9 SEMAINES**

**Tardieu Didier 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 (dont la fumonisine B1 - FB1 - est la plus abondante et la plus toxique) sont des mycotoxines largement répandues dans le monde, produites par *Fusarium verticillioides* lors de son développement sur le maïs. Lors d'exposition à ces composés, différents effets sur la santé liés à la dose et à la durée de l'exposition peuvent être observés. La toxicité des fumonisines apparaît ainsi comme cumulative dans la plupart des espèces animales. Paradoxalement, l'étude de leur toxicocinétique révèle que ces toxines ne sont pas accumulées.

L'objectif de cette étude est de caractériser la toxicocinétique plasmatique d'une forte dose de FB1 (100 mg/kg de poids vif) administrée par gavage par voie orale à des dindes préalablement exposées pendant 9 semaines à un aliment indemne de fumonisines ou un aliment contaminé à hauteur de 20 ppm (5 animaux par groupe). Dans cette espèce, à cette dose, les fumonisines entraînent une altération du métabolisme des sphingolipides sans altération de la santé. Des prélèvements plasmatiques ont été réalisés 0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10 heures après administration. Le dosage de la toxine a été effectué par fluorimétrie après séparation HPLC et purification des échantillons sur colonne. Les principaux résultats obtenus révèlent que chez les dindes exposées à de l'aliment indemne, le pic de concentration plasmatiques moyen est obtenu 180 minutes après l'administration, avec une concentration maximale de 1 µg/ml de plasma. La biodisponibilité est estimée à 2 %, avec une bonne homogénéité de résultats entre animaux. En revanche, chez les dindes préalablement exposées à 20 ppm de fumonisines dans l'aliment pendant 9 semaines, si le pic de concentration plasmatique moyen est toujours obtenu à 180 minutes la concentration maximale moyenne n'est que de 0,5 µg/ml de plasma. La biodisponibilité est estimée à 0,8 %, avec une forte hétérogénéité de cinétique entre les animaux. Les mécanismes à l'origine de ces différences restent à déterminer.

ABSTRACT

Fumonisin (from whom fumonisin B1 – FB1 – is the most abundant and the most toxic compound) are frequent contaminants found worldwide and produced by *Fusarium verticillioides* during its development on maize. During exposure to these molecules, several effects can be observed on health, depending on the dose and the length of exposure. Paradoxically, toxicokinetics studies reveal that these toxins do not accumulate.

Aim of this study is to characterize the plasmatic kinetics of one high dose of FB1 (100 mg/kg body weight) administrated by oral route to turkeys previously exposed to a feed free from the toxin or to a 20 ppm contaminated one during a 9 weeks period (5 animals per group). In this animal species, at this concentration, fumonisins lead to disruption of sphingolipid metabolism without any effect on animal's health. Samples of plasma were taken 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, and 10 hours after toxin administration. Quantification of the toxin was done by fluorimetry after HPLC separation and sample purification on column. Main obtained results demonstrate that, in turkeys previously exposed to toxin free feed, plasmatic concentration of FB1 reach a peak 180 minutes after administration, the maximal plasmatic concentration being 1 µg/ml. Biodisponibility of the toxin was estimated to be about 2% with a satisfactory homogeneity of results between animals. On the other hand, in turkeys previously exposed to a 20 ppm contaminated feed during a 9 weeks period, maximal concentration obtained was only 0.5 µg/ml plasma, this peak being reach at 180 minutes after administration of the toxin. In this case, biodisponibility of FB1 was estimated to be about 0.8% with an important heterogeneity between animals. The mechanisms at the origin of these differences remain to be determined.

INTRODUCTION

Diverses affections sont associées chez l'animal à la consommation de maïs contaminé par *F. verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*): leucoencéphalomalacie chez les équidés, œdème pulmonaire chez les porcins, atteintes hépatiques dans la plupart des espèces animales, y compris la volaille (JECFA, 2002).

Les premières reproductions expérimentales de ces affections ont établies le caractère cumulatif de cette intoxication chez les équidés et les porcins. Paradoxalement, l'analyse de la toxicocinétique des fumonisines révèle une faible biodisponibilité orale et une excrétion rapide, peu compatible avec une toxicité cumulative (JECFA, 2002).

Chez la volaille, bien que différentes études de toxicité aiguë et chronique aient été réalisées, le caractère cumulatif de la toxicité des fumonisines n'a pas été aussi clairement établi. Certains travaux chez le poulet suggèrent même que les altérations biochimiques témoins d'une souffrance hépatique lors d'administration de 20 mg de fumonisines/kg d'aliment pendant 21 jours ne sont plus présentes lors d'administration de 25 à 50 ppm pendant 49 jours (Weibking et al., 1993 ; Henry et al., 2000 ; Broomhead et al., 2002). Ces premiers résultats ont été confirmés chez le canard (Tardieu et al., 2006 ; Tran et al., 2005 et 2006). Ces études ont clairement démontré le caractère réversible de l'atteinte hépatique, tant au niveau des altérations biochimiques non spécifiques qu'en ce qui concerne le métabolisme des sphingolipides.

L'objectif des travaux présentés est de caractériser la toxicocinétique plasmatique d'une forte dose de FB1 (la plus abondante et la plus toxique des fumonisines [Henry et al., 2001]) administrée par voie orale à des dindes préalablement exposées pendant 9 semaines à un aliment indemne de fumonisines ou un aliment contaminé à hauteur de 20 ppm. Le niveau d'exposition de 20 ppm a été retenu car c'est la plus forte teneur en fumonisines recommandée par la CCE dans les aliments pour volailles (j.o. UE, 2006). Dans cette espèce, à cette dose, les fumonisines entraînent une altération du métabolisme des sphingolipides au niveau hépatique et rénal sans altération de la santé (aucun effet sur la consommation d'aliment, la croissance, les marqueurs biochimiques de souffrance hépatique). L'intérêt de ce travail est de révéler si une exposition chronique aux fumonisines est susceptible de modifier leur devenir et par là même d'expliquer que leurs effets sur la santé soient moins importants lors d'exposition chronique. Ces résultats peuvent également avoir un intérêt en termes de persistance de résidus dans les tissus carnés lors d'exposition aiguë ou chronique.

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. Production de fumonisines et préparation de la solution de gavage

Comme précédemment décrit, la production de fumonisines a été réalisée en utilisant une souche hautement toxigène de *F. verticillioides* (NRRL-3428) isolée du maïs lors d'un accident de leucoencéphalomalacie équine (Bailly et al., 2005). Brièvement, du maïs stérilisé à l'autoclave a été inoculé avec 1 cm² de culture secondaire de *F. verticillioides* réalisée sur PDA. Les flacons obtenus ont été incubés 1 semaine à 20°C. Le milieu de culture a été extrait par agitation mécanique durant 12 heures dans un mélange méthanol/eau (3/1, v/v). Les extraits ont été filtrés puis concentrés par évaporation du méthanol. Les fumonisines ont été dosées par HPLC comme décrit ci-dessous. La pureté moyenne de l'extrait brut ainsi obtenu est de 54% FB1, 8% FB2 et 9% FB3. Vingt neuf pour cent de l'extrait sont constitués par des pigments du maïs. Une purification complémentaire de l'extrait brut a été réalisée sur colonnes SAX. Après filtration sur un filtre Fiorini N° 3 (VWR, Fontenay sous Bois, France), 10 ml de l'extrait ont été appliqués sur des colonnes SAX Bond-Elut (500mg, 2,8 ml) (VWR, France) et élué avec 14 ml de méthanol acidifié (acide acétique 0,5%). Ces extraits ont été évaporés à sec sous flux d'azote et dosés par HPLC. Le rendement du procédé de purification est de 96 ± 2%. Cet extrait purifié a été dilué dans de l'eau afin d'obtenir une concentration finale en FB1 de 10 mg/ml.

1.2. 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 par des mycotoxines 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

obtenus en final en fumonisines sont les suivants : 0 et 20 ppm.

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

1.3. Animaux et prélèvements

A l'issue d'une phase d'adaptation d'une semaine à la station expérimentale de Pouligne, 10 dindonneaux de souche BUT 9 de 7 jours ont été répartis en 2 lots de 6 sur la base de leur poids vif et placés en cage individuelle. Les aliments à 0 et 20 ppm ont été administrés à volonté pendant 9 semaines. Les animaux ont été pesés et la consommation d'aliment a été mesurée chaque semaine. A l'issue de cette période une étude de cinétique a été réalisée. En début du programme lumineux, un libre accès à l'aliment a été laissé durant 15 minutes. Puis l'aliment a été retiré, les animaux ont été pesés et une prise de sang a été réalisée pour constituer le temps 0 de la cinétique. 100 mg de FB1/kg de poids vif ont été administrés par gavage sous un volume de 10 ml/kg. Les animaux ont été replacés en cage avec libre accès à l'aliment. Des prélèvements sanguins (2 ml) ont été effectués 0,5, 1, 2, 3, 5, 7 et 10 heures après administration de la toxine. Tous les prélèvements ont été réalisés à la jugulaire sur seringue héparinée et mis de suite dans un tube EDTA. Les tubes ont été centrifugés 15 min à 3000g. Le plasma a été prélevé et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

1.4. Dosage de la FB1

Le dosage de la FB1 dans le plasma est effectué en fluorescence après séparation par HPLC d'échantillons préalablement purifiés sur colonnes.

A 250 µl de plasma sont ajoutés 500 µl de tampon borate (0,1 M, pH 5,8) et 750 µl d'acétonitrile. L'ensemble est agité 30 minutes (300 rpm) puis centrifugé 15 minutes (2500 g). Le surnageant est récupéré et délipidé sur colonnes C18. L'extrait délipidé est récupéré par élution dans un mélange acétonitrile/tampon borate pH 5,8 (v/v) puis purifié sur colonnes SAX (Bondelut, Varian, Harbor City, USA). L'extrait purifié est lavé par 8 ml d'un mélange méthanol/eau (75/25, v/v) puis par 3 ml de méthanol. La FB1 est éluée par 10 ml d'un mélange méthanol/acide acétique (99/1, v/v). L'éluât est évaporé à l'obscurité sous un courant d'azote et repris dans 250 µl d'un mélange acétonitrile/eau (v/v), agité au vortex 30 secondes puis passé aux ultrasons 5 minutes.

La FB1 est alors dérivatisée en vue de la rendre fluorescente et de permettre son dosage. A 50 µl d'extrait purifié sont ajoutés 50 µl de tampon borate pH 8,6, 50 µl d'eau et 50 µl de réactif OPA (5 mg

d'O-phthalaldéhyde, 2,5 ml d'acétonitrile, 5 µl de bétamercaptoéthanol). Une minute après, 20 µl de ce mélange sont injectés dans le système chromatographique : pompe M2200 (Bischoff, Leonberg, Allemagne) reliée à une colonne ProntoSil C18 (Bischoff Chromatography, Leonberg, Allemagne) de porosité 5 µm et de taille 250 x 4,6 mm. Cette dernière est connectée à un détecteur de fluorescence RF 10A XL (Shimadzu, Kyoto, Japon) et un système d'acquisition PIC3 (ICS, Toulouse, France). La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol/ tampon phosphate 0,1M, pH 3,35 (75/25, v/v). Le débit est ajusté à 1 ml/min. La détection se fait à 440 nm après excitation à 335 nm. Le temps de rétention du pic de FB1 est de dix minutes. Les quantités de FB1 sont déterminées par régression linéaire en comparant l'aire obtenue à celles obtenues avec des standards de concentration connues. Le pourcentage d'extraction moyen est de 60%.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Devenir de la FB1 chez les animaux non exposés

Les cinétiques obtenues pour chaque dinde sont données dans la figure 1A. Les tracés sont relativement homogènes pour les différents animaux. Le pic de concentration plasmatique est obtenu entre 3 et 5 h après administration. La teneur maximale en FB1 dans le plasma varie de 0,5 à 1,9 µg/ml. La biodisponibilité a été estimée par comparaison à des études antérieures sur canards (données non communiquées). Elle varie de 1,8 à 2,2 %. Bien que cette estimation ne soit qu'une première approche, elle est de l'ordre de grandeur de ce qui a été observé chez le canard et les espèces mammifères (Bluteau, 2006). En fin d'étude, les courbes obtenues pour les différents animaux ne sont pas exactement parallèles ce qui suggère que de la toxine est encore absorbée et/ou distribuée dans l'organisme. Ce résultat est en accord avec des études antérieures conduites chez la poule pondeuse à l'aide de toxine radiomarquée (Vudathala et al., 1994). Il n'est donc pas possible de déterminer un temps de demi-élimination.

2.2. Devenir de la FB1 chez les animaux exposés à 20 ppm de fumonisines pendant 9 semaines

Les cinétiques obtenues pour chaque dinde sont données dans la figure 1B. Les tracés apparaissent fortement hétérogènes entre animaux. Pour 2 animaux (dindes N° 11 et 83), les courbes sont similaires à celles observées chez les animaux non exposés. Le pic de concentration plasmatique est obtenu à 3 h, la teneur maximale en FB1 est voisine de 1 µg/ml et la biodisponibilité est voisine de 2 %

Pour 1 animal (dinde N° 41), un pic de concentration précoce est obtenu, suivi d'une rapide décroissance. Ce genre de tracé correspond à ceux obtenus chez les palmipèdes lors d'administration de toxine en solution orale en l'absence d'aliment. Il est donc possible que cet animal n'ait pas ou peu mangé en début du programme lumineux et régurgité une part de la toxine administrée.

Pour les 3 animaux restant (dindes N° 71, 91 et 133), il est difficile d'observer un pic de concentration. Les profils sont très écrasés et les concentrations maximales en FB1 ne dépassent pas 0,35 µg/ml. Il est très difficile d'estimer une biodisponibilité sur ce genre de tracés.

Les différences observées entre animaux sont difficiles à interpréter. Une première hypothèse fait intervenir un biais méthodologique lors d'administration de la toxine. Cette hypothèse semble rejetable car les animaux ont été traités dans les mêmes conditions en alternant les animaux préalablement exposés et les animaux non exposés. Une deuxième hypothèse fait intervenir un biais méthodologique au cours du dosage. Cette hypothèse peut là encore être écartée car les échantillons ont été traités en alternance et en duplicate. Une dernière hypothèse est que les animaux exposés aux fumonisines ne réagissent pas tous de la même manière. Pour certains, l'administration de fumonisines n'aurait que peu de conséquences sur son devenir lors d'expositions ultérieures, alors que pour d'autres, cette administration conduirait à une chute de biodisponibilité lors d'exposition ultérieure.

2.3. Comparaison des cinétiques moyennes obtenues chez les différents animaux

Les cinétiques moyennes obtenues pour les différents groupes de dindes objets de l'essai sont données dans la figure 2. La comparaison des tracés moyens obtenus révèle que les pics de concentration plasmatique sont toujours observés 3 h après l'administration. La teneur maximale en FB1 dans le plasma est voisine de 1µg/ml chez les animaux non préalablement exposés à la toxine contre 0,5 µg/ml chez les animaux exposés. Une biodisponibilité moyenne voisine de 2 % peut être estimée chez les animaux non exposés alors que cette biodisponibilité n'est que de 1% chez les animaux exposés. En fin d'étude les tracés obtenus sur les données moyennes sont parallèles, ce qui permet d'estimer un temps de demi-élimination voisin de 6h. Ce temps est supérieur à celui préalablement obtenu chez le canard, le rat et la poule pondeuse (Bluteau, 2005). Il confirme la persistance probable de processus d'absorption de la toxine dix heures après son administration orale. Les moyennes des concentrations plasmatiques obtenues pour les seuls animaux 71, 91 et 133 ont

également été rapportées sur la figure 3. Il est intéressant de constater que, si aucun pic de concentration plasmatique ne peut être obtenu, la phase terminale de la courbe est parallèle à celles obtenues avec les valeurs moyennes de tous les animaux. Une biodisponibilité de la toxine de l'ordre de 0,6% peut être estimée.

CONCLUSION

Cette étude suggère que la toxicocinétique de la FB1 est différente chez les dindes non exposées à la toxine et celles ayant préalablement ingéré un aliment contaminé à hauteur de 20 ppm en fumonisines pendant 9 semaines. Ces différences conduisent à une chute de la biodisponibilité chez les dindes exposées, de fortes variations individuelles étant constatées. Les mécanismes à l'origine de ces effets restent à établir.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient H. Clavé (Maisadour, 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 Maisadour, Syngenta Seeds, la région Midi-Pyrénées et le Ministère français de la Recherche dans le cadre du programme RARE Fusariotoxines 2003-2006.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bailly J.D. et al., 2005, Rev. Med. Vet., (156), 5547-554.
- Bluteau C., 2005. Thèse Doctorat Vétérinaire, Toulouse.
- Broomhead J.N. et al., 2002. Poult. Sci., (81), 56-61.
- JECFA Fumonisins, World Health Organization, Geneva, 2002.
- Journal officiel UE, 23/8/2006. L229/7.
- Henry M.H. et al., 2000. Poult. Sci., (79), 871-878.
- Henry M.H. et al. 2001. Poult. Sci., (80), 401-407.
- Tardieu D. et al., 2004. Poult. Sci., (83), 1378-84.
- 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. Evolution des concentrations plasmatiques en FB1 chez la dinde après administration orale d'une dose flash de 100mg/kg en cours de repas (les numéros représentent les numéros attribués au cours de l'essai).

A : données individuelles sur 6 animaux ayant ingéré un aliment indemne de fumonisines,
 B : données individuelles sur 6 animaux ayant ingéré un aliment contenant 20 ppm de fumonisines.

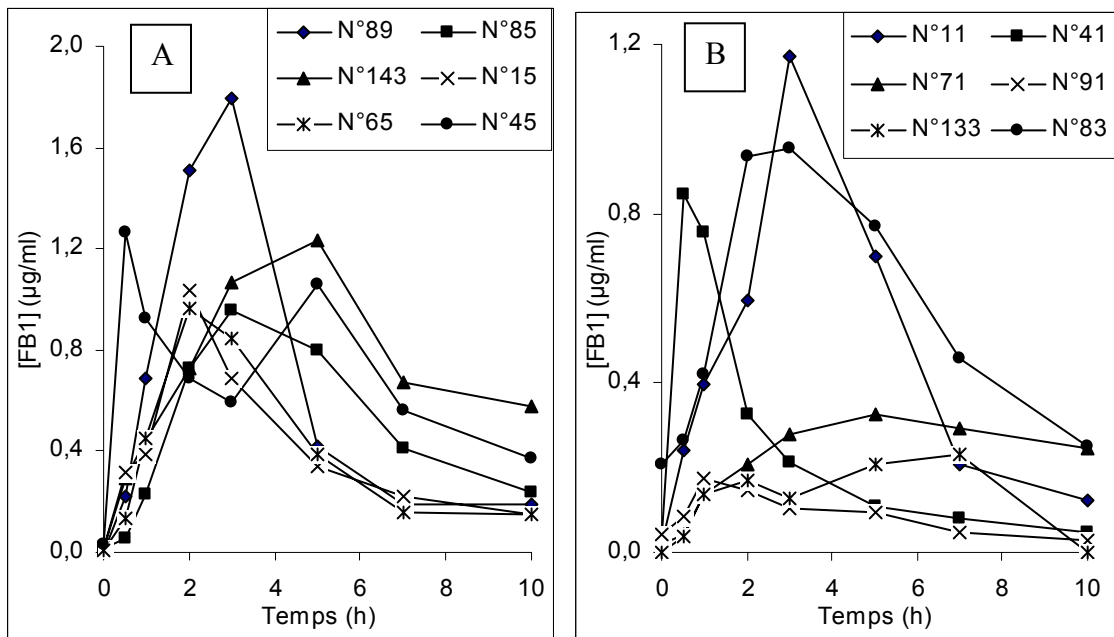


Figure 2. Evolution des concentrations plasmatiques en FB1 chez la dinde après administration orale d'une dose flash de 100mg/kg en cours de repas (moyennes +/- SE). - o - animaux non exposés aux fumonisines, - ● - animaux ayant ingéré pendant 9 semaines un aliment contenant 20 ppm de fumonisines, - ▲ - seuls animaux N° 71, 91 et 133 du groupe ayant ingéré un aliment contenant 20 ppm de fumonisines

