



HAL
open science

Une nouvelle classe de mycotoxines : les fumonisines

Céline Ducret

► **To cite this version:**

Céline Ducret. Une nouvelle classe de mycotoxines : les fumonisines. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01300154

HAL Id: dumas-01300154

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01300154>

Submitted on 8 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

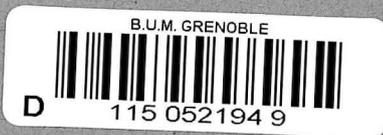
LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2^e exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2000

N° D'ordre :

7053

**UNE NOUVELLE CLASSE DE MYCOTOXINES :
LES FUMONISINES**

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

DUCRET CELINE

Née le 05 Octobre 1974 à Chambéry

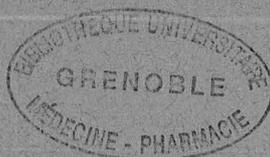
THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21 DECEMBRE 2000 A 17 HEURES

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Monsieur le Docteur Serge Krivobok , Président du jury

Monsieur le Docteur Philippe Saviuc

Monsieur Jean-Luc Milleret , Pharmacien



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	<i>Josette</i>	<i>Chimie Analytique</i>
BAKRI	<i>Abdelaziz</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>
BENOIT-GUYOD	<i>Jean-Louis</i>	<i>Chimie Toxicologie et Eco- toxicologie</i>
CALOP	<i>Jean</i>	<i>Pharmacie Clinique et Bio- technique</i>
CUSSAC	<i>Max</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
DECOUT	<i>Jean-Luc</i>	<i>Chimie Générale</i>
DEMENGE	<i>Pierre</i>	<i>Physiologie/Pharmacologie</i>
DROUET	<i>Emmanuel</i>	<i>Microbiologie-Immunologie</i>
FAVIER	<i>Alain</i>	<i>Biochimie</i>
GOULON	<i>Chantal</i>	<i>Physique-Pharmacie</i>
GRILLOT	<i>Renée</i>	<i>Parasitologie</i>
MARIOTTE	<i>Anne-Marie</i>	<i>Pharmacognosie</i>
RIBUOT	<i>Christophe</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie</i>
ROUSSEL	<i>Anne-Marie</i>	<i>Biochimie</i>
SEIGLE-MURANDI	<i>Françoise</i>	<i>Botanique et Cryptogamie</i>
STEIMAN	<i>Régine</i>	<i>Biologie Cellulaire</i>
WOUESSIDJEWÉ	<i>Denis</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	<i>Delphine</i>	<i>Parasitologie</i>
ALLENET	<i>Benoit</i>	<i>Pharmacie Clinique</i>
BARTOLI	<i>Marie-Hélène</i>	<i>Pharmacie Clinique et Biotech.</i>
BOUMENDJEL	<i>Ahcène</i>	<i>Pharmacognosie</i>
BURMEISTER	<i>Wilhelm</i>	<i>Physique</i>
CARON	<i>Cécile</i>	<i>Biologie Moléculaire</i>
CHARLON	<i>Claude</i>	<i>Chimie Pharmacie</i>
DELETRAZ	<i>Martine</i>	<i>Droit Economie pharmaceutique</i>
DIJOUX-FRANCA	<i>M.-Geneviève</i>	<i>Pharmacognosie</i>
DURMORT-MEUNIER	<i>Claire</i>	<i>Virologie moléculaire structur</i>
ESNAULT	<i>Danielle</i>	<i>Chimie Analytique</i>
FAURE	<i>Patrice</i>	<i>Biochimie C</i>
FAURE-JOYEUX	<i>Marie</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie.</i>
FOUCAUD-GAMEN	<i>Jacqueline</i>	<i>Bactériologie-Virologie.</i>
GEZE	<i>Annabelle</i>	<i>Pharmacotechnie Galénique</i>
GILLY	<i>Catherine</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
GUIRAUD	<i>Pascale</i>	<i>Biologie cellulaire</i>
GROSSET	<i>Catherine</i>	<i>Chimie analytique</i>
HININGER-FAVIER	<i>Isabelle</i>	<i>LBSO-Biochimie C</i>
KRIVOBOK	<i>Serge</i>	<i>Botanique-Cryptogamie</i>
MORAND	<i>Jean-Marc</i>	<i>Chimie thérapeutique</i>
NICOLLE	<i>Edwige</i>	<i>Chimie organique</i>
PERA	<i>Marie-Hélène</i>	<i>Chimie organique</i>
PEYRIN	<i>Eric</i>	<i>Chimie Analytique Alimentaire</i>
PINEL	<i>Claudine</i>	<i>Parasitologie</i>
RAVEL	<i>Anne</i>	<i>Chimie Analytique</i>
RIBUOT	<i>Diane</i>	<i>Physio. Pharmaco</i>
RICHARD	<i>Jean-Michel</i>	<i>Chimie Toxic-Ecotoxicologie</i>
RIONDEL	<i>Jacqueline</i>	<i>Physiologie Pharmacologie</i>
TAILLANDIER	<i>Georges</i>	<i>Chimie organique</i>
VILLEMAIN	<i>Danièle</i>	<i>Physique Pharmacie</i>
VILLET	<i>Annick</i>	<i>Chimie analytique</i>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2000

N° D'ordre :

**UNE NOUVELLE CLASSE DE MYCOTOXINES :
LES FUMONISINES**

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

DUCRET CELINE

Née le 05 Octobre 1974 à Chambéry

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21 DECEMBRE 2000 A 17 HEURES

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Monsieur le Docteur Serge Krivobok , Président du jury

Monsieur le Docteur Philippe Saviuc

Monsieur Jean-Luc Milleret , pharmacien

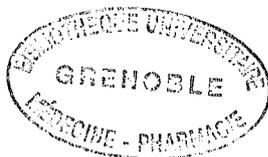


TABLE DES MATIERES

Professeurs de pharmacie	1
Maîtres de conférence de pharmacie	2
Page de titre	3
Table des matières	4
Lexique	7
Introduction	8
Chapitre 1: Source et présence des fumonisines dans l'environnement	11
1.1- Source	12
1.2- Présence dans l'environnement	13
1.2.1- Végétaux et produits d'origine végétale	15
1.2.1.1- Aliments pour animaux	15
1.2.1.2- Récoltes agricoles	17
1.2.1.3- Alimentation humaine	19
1.2.2- Produits d'origine animale	23
1.2.2.1- Lait	23
1.2.2.2- Tissus animaux	23
Chapitre 2: Biosynthèse des fumonisines	25
2.1- Contamination fongique aux différents stades de développement d'un épi de maïs	26
2.2- Facteurs favorisant la synthèse des fumonisines	28
2.2.1- Influence de la température	28
2.2.2- Influence de l'humidité	30
2.2.3- Influence de l'aération	30
2.2.4- Influence du pH	32
2.2.5- Présence d'autres espèces fongiques	33
2.2.6- Influence de l'acide propionique	33
2.3- Biosynthèse	34
2.3.1- Formules chimiques	34

2.3.2- Synthèse	34
Chapitre 3: Métabolisme et stabilité des fumonisines	37
3.1- Métabolisme	38
3.1.1- Absorption	38
3.1.2- Distribution tissulaire et excrétion	38
3.1.2.1- Etudes chez le rat	38
3.1.2.2- Etude chez le bœuf	39
3.1.2.3- Etude chez le singe	39
3.1.2.4- Etude chez le porc	40
3.2- Stabilité	40
3.2.1- Effets des traitements physiques	40
3.2.1.1- Lavage et ébullition	40
3.2.1.2- Température	40
3.2.1.3- Irradiation <i>gamma</i>	41
3.2.2- Effets des traitements chimiques	41
3.2.2.1- Ammoniaque	41
3.2.2.2- pH	42
Chapitre 4: Techniques de dosage des fumonisines	44
4.1- Propriétés physiques et chimiques des fumonisines	45
4.2- Techniques de dosage des fumonisines	45
Chapitre 5: Effets toxiques des fumonisines	51
5.1- Effets des fumonisines chez l'animal	52
5.1.1- Intoxication naturelle	54
5.1.2- Etudes expérimentales chez l'animal	54
5.1.2.1- Intoxication aiguë	54
5.1.2.1.1- Etude chez le cheval	54
5.1.2.1.2- Etude chez le singe	54
5.1.2.1.3- Etude chez le porc	55
5.1.2.1.4- Etude chez les animaux de laboratoire	56

5.1.2.2- Intoxication chronique	56
5.1.2.2.1- Leucoencéphalomalacie équine	56
5.1.2.2.2- Carcinogénicité	59
5.1.2.2.3- Embryotoxicité	59
5.1.2.2.4- Mutagénicité et génotoxicité	60
5.1.3- Mode d'action des fumonisines	60
5.1.3.1- Inhibition de la céramide synthétase <i>in vitro</i>	62
5.1.3.2- Inhibition de la céramide synthétase <i>in vivo</i>	63
5.1.3.3- Toxicité des fumonisines due à l'altération de la synthèse des sphingolipides	65
5.1.3.4- Autres mécanismes	67
5.2- Effets des fumonisines chez l'homme	68
Conclusion	70
Conclusions de la thèse	73
Bibliographie	75
Serment des apothicaires	85

LEXIQUE

Acineuse: qui se rapporte aux acini; qui est constitué par des acini, petites cavités glandulaires en forme de cul-de-sac, se déversant dans un canal excréteur

Amaurose: perte plus ou moins complète de la vue, sans lésion de l'œil

Apoptose: mort programmée d'une cellule

Ataxie: mauvaise coordination des mouvements. L'ataxie peut se manifester dans la station debout, dans la marche ou lors de l'exécution d'un mouvement

Bradypnée: respiration anormalement lente

Chromatolyse: dissolution, disparition de la chromatine du noyau de la cellule au cours de sa nécrose

Fibrose: formation pathologique de tissu fibreux

Hydrothorax: épanchement pleural d'une sérosité non inflammatoire

Hyperesthésie: exagération de la sensibilité

Inappétence: diminution de l'appétit

Léthargie: état pathologique de sommeil profond, simulant la mort, mais sans arrêt des fonctions vitales, pouvant durer de quelques heures à plusieurs années, en général provoqué par des infections graves avec atteinte des centres nerveux supérieurs

Malacie: ramollissement pathologique d'un tissu ou d'un organe

Nécrose: processus de dégénérescence aboutissant à la destruction d'une cellule ou d'un tissu

Tellurique: qui se rapporte à la terre et à son influence sur les maladies

Tuméfaction: augmentation de volume, gonflement pathologique, d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou d'une partie du corps.

INTRODUCTION

Depuis des temps très anciens, on connaît l'importance des métabolites toxiques des moisissures (mycotoxines) et les troubles qu'ils engendrent (mycotoxicoses). Dès le Moyen Age, des chroniques religieuses font état d'épidémies portant le nom évocateur de feu de Saint Antoine ou "mal des ardents"; ceux qui en sont victimes présentent hallucinations et troubles pouvant entraîner la mort. On connaît déjà, à l'époque, la relation entre cette maladie et la consommation de farines moisies, contaminées par l'ergot, forme résistante d'un champignon microscopique *Claviceps purpurea* (Fries : Fries) Tulasne. L'ergotisme fut responsable de la mort de milliers de personnes durant le Moyen Age. Dans des temps plus modernes, de nombreux autres cas de mycotoxicoses sont rapportés à travers le Monde entier. Par exemple, dans les années 1920 aux Etats-Unis, on parle de poisons issus de souches d'*Aspergillus* qui déciment le bétail. Dans les années 1930, en Union Soviétique, la stachybotryotoxicose entraîne la mort de nombreux chevaux. Cette toxicose est due à un champignon, *Stachybotrys atra* Corda se développant dans le foin. Mais c'est à partir des années 1960 que les mycotoxines et les mycotoxicoses vont susciter un intérêt croissant avec la découverte d'une substance toxique appelée aflatoxine, sécrétée par certaines souches d'*Aspergillus flavus* Link et *A. parasiticus* Speare. L'aflatoxine est mise en cause dans une grave intoxication appelée maladie X des dindons. Des milliers d'animaux meurent après avoir ingéré des tourteaux d'arachide contaminés par *A. flavus*.

Depuis les années 1960, de nombreux travaux sont consacrés à l'étude des mycotoxines.. Leur implication dans diverses pathologies animales et les répercussions économiques qui en découlent sont bien connues; cependant, leur incidence sur la santé humaine reste toujours d'actualité. On sait que les mycotoxines sont des composés naturels élaborés par de nombreuses espèces de moisissures qui peuvent se développer à tous les stades de la chaîne alimentaire, depuis le champ de culture jusqu'à la préparation des aliments destinés à l'homme. Les espèces d'élevage peuvent constituer un vecteur de la présence de ces toxines ou de leurs métabolites dans des productions telles que la viande, le lait ou les œufs. On sait d'autre part, que certaines moisissures sont utilisées dans l'élaboration de condiments, de boissons fermentées ou d'aliments comme les fromages ou les salaisons et de ce fait, doivent répondre à des critères stricts de qualité et de sécurité.

En 1988, une équipe de chercheurs sud-africains caractérise une nouvelle famille de mycotoxines produites par des moisissures du genre *Fusarium*: les fumonisines.



Trois formes sont trouvées dans la nature: fumonisines B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) et B₃ (FB₃). Des recherches ultérieures ont montré qu'il existe d'autres métabolites: ce sont les fumonisines A₁ (FA₁), A₂ (FA₂), B₄ (FB₄) et C (FC).

Ces toxines sont à l'origine d'une maladie nerveuse constatée chez les chevaux consommant du maïs moisi dès la deuxième moitié du 20^{ème} siècle aux Etats-Unis. En 1971, on identifie le champignon responsable: *Fusarium moniliforme* Sheldon. Cette dernière décennie, les fumonisines ont fait l'objet de nombreuses études. Ce travail bibliographique regroupe les principaux résultats obtenus lors de recherches concernant les sources et la présence dans l'environnement de ces toxines, leur biosynthèse, leur métabolisme chez l'animal, leurs effets toxiques chez l'homme et l'animal, et les principales méthodes d'analyse et de dosage des fumonisines dans les denrées alimentaires.

CHAPITRE 1

SOURCE ET PRESENCE DES FUMONISINES DANS L'ENVIRONNEMENT

La grande constante épidémiologique retrouvée dans tous les cas de leucoencéphalomalacie équine, est la présence de maïs ou de dérivés de maïs dans l'alimentation des chevaux.

De nombreuses toxines, produites par des moisissures affectant le maïs, ont été associées à une variété de maladies touchant à la fois le bétail et les êtres humains. Bien que les champignons les plus connus soient *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* par la production d'une toxine hautement carcinogène, l'aflatoxine B₁, l'espèce retrouvée le plus fréquemment dans le maïs est *F. moniliforme*. Il se développe dans le monde entier, partout où le maïs est cultivé, à l'exception des régions froides comme le nord-est de l'Europe ou le Canada qui semblent échapper à ce problème (60).

1.1- Source

Les fumonisines sont des métabolites secondaires produits par des micromycètes du genre *Fusarium*: principalement *F. moniliforme*, et quelques espèces morphologiquement voisines, *F. proliferatum* Nirenberg et *F. nygamai* Burgess et Trimboli.

Après *F. moniliforme*, *F. proliferatum* est le plus important producteur de fumonisines. Sa présence ubiquitaire dans le maïs a été associée à des mycotoxicoses animales comme l'oedème pulmonaire aigu porcin (95) ou la leucoencéphalomalacie équine (69). *F. nygamai* se développe principalement dans l'hémisphère sud, Porto Rico et la Thaïlande et a été trouvé infectant les graines de millet et le sorgho.

D'autres espèces ont été rapportées comme produisant des fumonisines, *Fusarium anthophilum* Braun Wollenweber et *F. dlamini* Marasas, mais, sont sans intérêt. En effet, on ne les trouve pas dans le maïs ou dans d'autres graines alimentaires majeures, et leur présence en faible quantité est limitée à des régions d'Afrique du Sud ou d'Australie (49).

F. moniliforme est un champignon endophyte pouvant coloniser la plante en croissance sans signe apparent. Les points d'entrée du champignon sont variés. Il peut se développer dans les racines, les jeunes feuilles, les parties végétatives ou directement dans les graines (3). Par ailleurs, l'infestation de la graine peut se produire par l'intermédiaire de trous ou de fissures dans le péricarpe, comme par exemple en des points où le péricarpe est déchiré par l'émergence des jeunes plants (47).

Il fait partie de la mycoflore tellurique* et peut être apporté par le vent ou les insectes. Il est important de souligner que les graines atteintes ne présentent pas forcément d'altérations visibles.

La capacité naturelle de *Fusarium moniliforme* à produire des fumonisines est hautement dépendante des conditions environnementales: climat, sécheresse, saison...(ces facteurs seront étudiés au chapitre 2).

F. moniliforme est le nom donné à deux des formes végétatives de *Gibberella fujikuroi* (37). C'est l'espèce appelée " population A " qui a la plus grande capacité à produire des fumonisines (15, 38).

On trouve dans le genre *Fusarium* des espèces qui élaborent d'autres mycotoxines: *Fusarium subglutinans* (Wollenweber et Reinking) Nelson produisant la moniliformine, *F. graminearum* Schwabe produisant la zéaralenone et *F. oxysporum* Schlechtendahl qui produit des trichothécènes. Un même végétal peut donc contenir une ou plusieurs de ces mycotoxines.

1.2- Présence dans l'environnement

Depuis leur isolation et caractérisation en 1988, de très nombreuses études ont porté sur la présence naturelle des fumonisines dans l'environnement à travers le monde. Les deux premiers articles proviennent d'Afrique du Sud où est publiée pour la première fois la structure des toxines (22, 6).

L'intérêt pour ces composés augmente de manière significative pendant les années 1989 et 1990 aux Etats-Unis, du fait de nombreuses épidémies de mycotoxicoses survenues dans le bétail, au moment de la récolte de maïs de 1989 (41). Soulignons que les signes caractéristiques de la leucoencéphalomalacie équine furent évoqués pour la première fois aux USA en 1850 (12).

La première étude sur la présence des fumonisines en Europe se situe en Autriche, pour du maïs moisi colonisé par *Fusarium verticilloïdes*, autre nom donné à *F. moniliforme* (99).

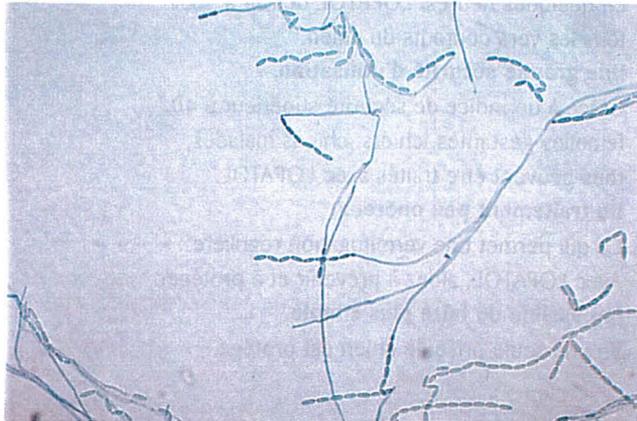
Sept fumonisines de structure proche ont été élaborées et isolées (75, 80). Sur ces sept toxines, FB₁, FB₂ et FB₃ sont les composés majeurs habituellement isolés de maïs naturellement contaminé ou de cultures fongiques sur maïs (17). FB₁ est la toxine essentiellement retrouvée, à l'inverse de FB₃.

Nous limiterons notre étude à la présence dans l'environnement des fumonisines les plus couramment rencontrées: FB₁ et FB₂.

Figure 1: Echantillon d'aliment suspect destiné à l'examen myco-toxicologique. Les brisures de maïs sont visiblement moisies (3)



Figure 2: Microconidies en chaîne caractéristiques du *F. moniliforme* (3)



1.2.1- Végétaux et produits d'origine végétale

Les fumonisines ont été décelées dans une large variété de produits végétaux, qu'il s'agisse de récoltes agricoles, de produits d'origine végétale destinés à l'alimentation animale ou de denrées alimentaires pour la consommation humaine.

Le maïs est le végétal le plus touché; dans certaines parties du Monde comme l'Afrique du Sud ou la Chine, il constitue l'aliment de base pour des populations qui sont exposées quotidiennement à de forts taux de fumonisines (82). Complément alimentaire peu onéreux, le maïs, parfois moisi, est souvent donné à titre gratuit à des éleveurs amateurs (3).

1.2.1.1- Aliments pour animaux

A la fin des années 1980, des méthodes analytiques sont développées pour détecter les fumonisines dans les aliments destinés aux animaux.

Les taux de toxines trouvés dans la nourriture impliquée dans des épidémies de leucoencéphalomalacie équine peuvent s'élever jusqu'à 130 µg/g (Tableau 1).

Tableau 1- Nourriture pour animaux impliquée dans des cas de leucoencéphalomalacie

Aliments	Pays (année)	Echantillons positifs	Concentration en µg/g	Références
nourriture mixte	USA 84-85	13/13	1 - 32	82
nourriture mixte	USA 86	2/2	12 et 130	82
maïs blanc	USA 89	3/3	37 - 122	82
nourriture mixte	USA 89-90	77/98	< 1 - 126 ^a	77
maïs	USA 92-93	5/5	10 - 23	82
nourriture mixte	Afrique du Sud 90	1/1	8,85	82
maïs	Italie 93	1/?	60	82
maïs	Brésil 85-90	14/14	0,2 - 38,5	82

^a 75 % des échantillons ont un taux de fumonisines supérieur à 10 µg/g
98 échantillons testés associés à 44 cas de LEM

Les porcs sont moins sensibles que les chevaux aux effets des fumonisines et on a trouvé des taux extrêmement élevés, 330 µg/g, dans des aliments associés à des cas d'œdème pulmonaire porcin (Tableau 2).

Les implications économiques de cette nourriture contaminée sont importantes, surtout si cela conduit à la mort du bétail.

Tableau 2- Nourriture pour animaux impliquée dans des cas d'oedème pulmonaire porcin

Aliments	Pays (année)	Echantillons positifs	Concentration en µg/g	Références
maïs	USA 89	29/29	20 - 330	53
maïs	USA 89	2 cas	105 et 155	82
nourriture mixte	USA 89-90	70/83	< 1 - 330 ^a	77
nourriture mixte	USA 90	2 cas	99 et 162	70
nourriture mixte	Brésil 85-90	3/3	8,5 - 11,1	82

^a 71 % des échantillons ont un taux de fumonisines supérieur à 10 µg/g
83 échantillons testés associés à 42 cas d'oedème pulmonaire

Tableau 3- Nourriture pour animaux non impliquée dans des mycotoxicoses

Aliments pour:	Pays (année)	Echantillons positifs	Concentration en µg/g	Références
divers	Italie	23/25	traces - 8,4	98
divers	France	43/58	traces - 8,8	98
divers	Espagne	2/2	144 - 731	99
volaille	Suisse 91	6/22	0 - 0,48	82
volaille	Inde	5/14	0,02 - 0,26	84
divers	Japon 88-92	6/6	0,3 - 2,4	82
divers	Corée 92	5/12	< 0,03 - 1,33	82
divers	Afrique du Sud 91-92	15/15	0,47 - 4,34	82
divers	Afrique du Sud 92	24/24	0,23 - 3,78	82
divers	Afrique du Sud 93	37/37	0,05 - 44,75	82
chevaux	USA 89-90	7/19	< 1 - 9	72
chevaux	USA 89-90	1/6	8	82
cochons	USA 89-90	8/21	< 1 - 8	82
volaille	USA 89-90	1/3	2	82
chats	USA 89-90	2/2	0,22 et 0,99	82
lapins	USA 89-90	0		82
rongeurs	USA 89-90	1/1	6	82
chiens	USA 89-90	2/2	0,82 - 1,41	82

Les études toxicologiques montrent que les niveaux d'exposition conduisant à des mycotoxicoses, ainsi que la nature des syndromes qui en découlent sont dépendants de l'espèce animale. Les chevaux sont les plus sensibles aux effets des fumonisines. Après les épidémies de leucoencéphalomalacie de 1989 et 1990 aux Etats-Unis (70), les chercheurs ont montré qu'un taux de 10 ppm de fumonisines dans l'alimentation peut être associé au développement de cette maladie. Pour prévenir ce risque, il a été recommandé qu'un taux maximum de 5 ppm soit autorisé dans la nourriture pour ces animaux (82).

De même pour les porcins, un taux maximum de 10 ppm a été recommandé pour prévenir le développement d'oedème pulmonaire (82).

Les bovins et volailles sont beaucoup plus résistants à la toxicité des fumonisines, d'où un niveau maximum recommandé de 50 ppm dans leur alimentation (82).

1.2.1.2- Récoltes agricoles

La contamination des récoltes agricoles à travers le Monde est dépendante de facteurs variés comme l'origine des cultures, le temps, la saison et les dommages dus aux insectes.

On peut voir l'influence des saisons en comparant les données recueillies pour une même région pendant plusieurs récoltes. Par exemple, les études sur le maïs récolté dans l'état américain d'Iowa entre 1988 et 1992 montrent des niveaux de contamination élevés durant les quatre premières années puis une chute en 1992 (Tableau 4). On attribue cette baisse aux conditions climatiques fraîches et humides; malgré la présence du champignon dans les plants, ils n'ont pas été stressés par la chaleur ou un manque d'eau.

Les taux de fumonisines sont plus élevés quand le maïs est de bonne qualité protéique (82). En effet, les cultures en Italie ou aux Etats-Unis sont plus touchées que celles en Amérique du Sud.

Tableau 4- Récoltes agricoles à travers le Monde

Récolte	Pays (année)	Echantillons positifs	Concentration en µg/g	Références
blé	France 96	28/46	< 0,005 - 0,58	4
blé	France 97	62/69	< 0,005 - 0,65	4
maïs	France 96	15/18	< 0,005 - 2,8	4
maïs	France 97	46/66	< 0,005 - 0,65	4
maïs	Italie 89-90	26/26	0,01 - 2,85	18
maïs	Italie 92	10/10	0,19 - 4,1	99
maïs	Espagne 92	10/10	0,005 - 2,613	99
sorgho	Espagne	3/3	0,7 - 36,1	99
maïs	Portugal 89/90	9/9	0,09 - 4,45	18
maïs	Pologne 89/90	2/7	0 - 0,03	18
maïs	Pologne 92	6/6	0,17 - 2,193	99
blé	Pologne	5/5	0,135 - 2,24	99
orge	Pologne	4/4	0,081 - 0,605	99
maïs	Croatie 89-90	11/19	0 - 0,07	18
maïs	Roumanie 89-90	3/6	0 - 0,03	18
maïs	Hongrie	70%	0,095 - 52,4 ^a	20
maïs	Philippines 95	26/50	0,057 - 1,82	105 ^b
maïs	Thaïlande 95	19/27	0,063 - 18,8	105 ^b
maïs	Indonésie 95	7/12	0,226 - 1,78	105 ^b
maïs	Vietnam 94	8/15	0,001 - 0,101	101
poudre de maïs	Vietnam 94	15/17	0,78 en moyenne	101 ^c
maïs	Chine 89 comté Linxian	48%	0,001 - 11,3 ^d	107
maïs	Chine 89 comté Shangqiu	25%	?	107
maïs	Chine	15/15	20 - 60	13
maïs moisi	Chine	16/16	18 - 155	13
maïs	Indes	45/54	0,01 - 64,7 ^e	84
sorgho	Indes	27/69	0,07 - 7,8 ^f	84
maïs	Népal 90-91	12/24	< 0,05 - 4,6	82
maïs	est et sud de l'Afrique ^g	37/40	0,02 - 2,725 ^h	17
maïs	Bénin 89-90	9/11	0 - 3,31	18

maïs	Zambie 89-90	20/20	0,02 - 1,71	18
maïs	Botswana 98	85%	0,02 - 1,27	85
maïs	Canada 92-94	1/3	0,12	82
maïs	Argentine 91	17/17	1,11 - 6,70	82
maïs	Argentine 96	37/50	0,085 - 16,76	14
maïs	Iowa (USA) 88	22/?	0 - 14,9	82
maïs	Iowa 89	44/?	0 - 37,9	82
maïs	Iowa 90	59/?	0 - 19,1	82
maïs	Iowa 91	50/?	0 - 15,8	82
maïs	Iowa 92	80/?	0 - 1,6	82

^a % de mycotoxines dans les échantillons: zéaralenone 17%, déoxynivalenol 13%, T-2 toxine 39%.

^b Au total, 89 échantillons pour les 3 pays. 48 % des échantillons contenaient également des aflatoxines.

^c Co-présence d'aflatoxines et de nivanéol.

^d Co-présence de trichothécènes.

^e 50/54 des échantillons contiennent de l'aflatoxine B₁.

^f 3/69 des échantillons contiennent de l'aflatoxine B₁.

^g Botswana, Kenya, Mozambique, Afrique du Sud, Tanzanie, Zambie, Zimbabwe.

^h 5/40 des échantillons contiennent de la zéaralenone.

1.2.1.3- Alimentation humaine

L'incidence de l'infection par *F. moniliforme* du maïs cultivé artisanalement ("home-grown") est corrélée avec le nombre important de cancer de l'oesophage dans une région d'Afrique du Sud appelée Transkei (95). C'est dans les zones rurales où le niveau d'incidence de la maladie est le plus haut, que l'on retrouve les taux de fumonisines les plus élevés (Tableau 6).

Les habitants de cette région séparent le maïs visiblement "bon" du maïs moisi, ce dernier étant utilisé pour brasser la bière, ce qui lui donne une saveur unique (50). Mais on sait que les fumonisines ne sont pas détruites au cours de la fermentation.

De multiples facteurs peuvent être à l'origine d'un cancer oesophagien et des déficiences en vitamines et en oligo-éléments ainsi qu'une surconsommation d'alcool et de tabac ont été mises en évidence chez les populations à risque de la région Transkei.

Ce lien entre taux élevé de fumonisines et cancer de l'oesophage a été montré dans d'autres régions du Monde, comme le nord de l'Italie et les comtés du Linxian et du Cixian de Chine (Tableau 5). Là encore, d'autres facteurs peuvent conduire au développement de cette maladie; la présence de nitrosamines dans l'alimentation chinoise a été évoquée (50, 82).

Tableau 5- Niveaux de fumonisines dans le maïs cultivé artisanalement en Chine (82)

Nature des échantillons	Origine du comté	Année	Echantillons positifs	FB ₁ en µg/g	FB ₂ en µg/g
maïs	Linxian	1989	13/27	< 0,10 - 2,96	< 0,10 - 0,55
maïs	Shangqiu	1989	5/20	< 0,10 - 1,73	< 0,10 - 0,45
maïs moisi	Linxian	1991	9/9	17,9 - 118,4	
maïs moisi	Cixian	1991	10/10	28,4 - 154,9	
maïs en poudre	Linxian	1991	7/7	19,8 - 60	
maïs en poudre	Cixian	1991	8/8	30,3 - 47,9	

Tableau 6- Niveaux de fumonisines dans le maïs cultivé artisanalement dans la région Transkei (Afrique du Sud) et incidence du cancer oesophagien (CO) (82)

Nature des échantillons	Incidence du CO	Année	Echantillons positifs	FB ₁ en µg/g	FB ₂ en µg/g
maïs visiblement "bon"	faible	1985	3/12	0 - 0,55	0 - 0,15
maïs visiblement "bon"	forte	1985	12/12	0,05 - 7,90	0 - 2,25
maïs moisi	faible	1985	11/11	0,45 - 18,90	0,15 - 6,75
maïs moisi	forte	1985	12/12	3,45 - 46,90	0,90 - 16,30
maïs visiblement "bon"	faible	1989	6/8	0 - 3,31	0 - 0,97
maïs visiblement "bon"	forte	1989	5/6	0 - 5,38	0 - 1,32
maïs moisi	faible	1989	7/7	0,11 - 11,34	0 - 3,70
maïs moisi	forte	1989	6/6	3,02 - 117,5	0,75 - 22,96

Tableau 7- Alimentation humaine à base de maïs

Nature de l'échantillon	Pays (année)	Echantillons positifs	Concentration en µg/g	Références
farine	France 92	1/1	1,24	82
polenta	Italie 94	12/14	> 1 - 6,6	98
maïs soufflé	Italie 94	100 %	> 6,1 pour FB ₁ > 0,52 pour FB ₂	19
farine et polenta	Italie 94	100 %	0,42 - 3,76 pour FB ₁ 0,02 - 0,91 pour FB ₂	19
maïs sucré	Italie 94	100 %	0,06 - 0,79	19
flocons de maïs	Italie 94	100 %	0,01 en moyenne	19
pop-corn	Italie 94	100 %	en moy. : > 0,06 pour FB ₁ > 0,02 pour FB ₂	19
flocons de maïs	Espagne 93	8/50	0,05 - 0,2	73
céréales pour petit déjeuner	Angleterre 97	24 %	0,011 - 0,194	56
polenta	Angleterre 97	?	0,016 - 2,124	56
farine	Autriche 92	3/3	< 0,05 - 1,15	82
semoule	Allemagne 92-94	38/49	< 0,01 - 0,13	82
nourriture pour enfants	Allemagne 94	0		82
flocons de maïs	Suède	0/26		82
farine	Suisse 93	27/27	< 0,01 - 2,20	82
céréales pour petit déjeuner	Suisse 91	1/12	0,06	82
farine	Thaïlande 93	6/6	0,48 - 0,88	82
débris de maïs	Japon 88-92	14/17	0,2 - 2,6	82
farine	Egypte 90-91	2/2	1,78 - 2,98	82
farine	Kenya 92	3/3	< 0,05 - 0,11	82
farine	Afrique du Sud 90-91	46/52	< 0,05 - 0,48	82
farine	Afrique du Sud 93	?/127	0 - 2,85	82
farine	Zimbabwe 92	3/3	1,06 - 3,63	82
biscuits	Costa Rica 92-93	89 %	0 - 2,13	97
farine	Pérou 90-91	1/2	0,66	82
farine	Venezuela 91	1/1	0,07	82

maïs blanc	Mexique 94	34/55	10 - 900	15
céréales pour petit déjeuner	Canada 91-94	11/52	< 0,10 - 0,32	82
farine	Canada 91-94	11/39	< 0,10 - 1,60	82
farine	USA 90-91	15/16	< 0,05 - 2,79	82
céréales pour petit déjeuner	USA 90-91	9/17	< 0,01 - 0,33	82
pop-corn	USA 90-91	2/2	0,01 - 0,06	82
débris	USA 90-91	10/10	0,11 - 2,55	82

On estime que la consommation journalière de maïs est de 460g pour un adulte d'un poids de 70kg dans la région Transkei contre 4g en Suisse et 7g en Angleterre ou en Allemagne (82).

On sait que la contamination moyenne par les fumonisines est de 1,7 μ g/g pour le maïs visiblement "bon" dans la région Transkei et 0,5 μ g/g en Europe.

Il est alors possible de calculer la consommation journalière de fumonisines pour un homme d'un poids de 70kg : 11,2 μ g/ kg de poids corporel pour la région Transkei, 0,03 pour la Suisse et 0,05 pour l'Angleterre ou l'Allemagne.

Des études sur le développement du cancer du foie chez des rats après ingestion de fumonisines, ont permis d'estimer un niveau de consommation sans observation d'effets toxiques (NOEL = "no-observed-effect level") (25). D'après ces résultats, la consommation journalière tolérable (NOEL/1000) de fumonisines est de 0,8 μ g/ kg de poids corporel/ jour.

Une autre étude, canadienne, a porté sur l'examen de 361 échantillons prélevés sur une période de quatre années (1992-1996). 64 échantillons contenaient 0,1 μ g/g ou plus de FB₁ et 10 échantillons contenaient 1 μ g/g ou plus de FB₁. On a estimé que la consommation en fumonisines représentait moins de 0,089 μ g/kg pour les enfants de 5 à 11 ans et était plus faible pour les autres groupes d'âge (33).

Si le risque paraît faible en Europe ou au Canada, la consommation des populations rurales de la région Transkei semble les exposer à un risque réel, d'autant plus qu'on ne tient pas compte de la consommation de bière qui est hautement contaminée.

1.2.2- Produits d'origine animale

1.2.2.1- Lait

Plusieurs études ont été entreprises pour déterminer la présence de fumonisines dans le lait de vaches ayant absorbé une nourriture contaminée.

En 1994, au Canada, Scott et coll. (76) ont nourri 4 vaches avec de la nourriture contaminée par FB₁ : - 2 vaches par voie orale avec respectivement 1 et 5 mg de FB₁/kg de poids corporel

- 2 autres vaches par injection intraveineuse respectivement de 0,05 et 0,20 mg de FB₁/kg de poids. La présence de toxines dans le lait ayant été déterminée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), (limite de détection: 3 à 7 ng/ml), aucun résidu n'est détecté dans le lait de ces 4 vaches.

En 1996, aux Etats-Unis, Richard et coll. (65) ont nourri pendant 14 jours, 2 vaches avec des aliments mélangés à une culture fongique de *F. moniliforme*. Les 2 vaches ont consommé en moyenne 3 mg de FB₁/kg de poids corporel / jour (limite de détection: 5ng de fumonisines/ml par CLHP). Aucun résidu n'est détecté dans les échantillons de lait.

Dans une autre étude, ils utilisent la CLHP, pour détecter la présence de fumonisines dans 165 échantillons de lait (40). Un seul est positif avec une teneur de 1,3 ng de FB₁/ml.

La transmission des fumonisines dans le lait de vaches ne paraît pas totalement exclue. Toutefois, ces résultats suggèrent que le risque d'exposition à ces toxines par la consommation de lait est très faible.

1.2.2.2- Tissus animaux

Comme nous le verrons dans le chapitre 3 (métabolisme), les fumonisines sont pauvrement absorbées par le tractus gastro-intestinal. Par conséquent, on retrouve peu de résidus dans les tissus animaux.

En 1996, Smith et coll. nourrissent pendant trente jours deux groupes de trois bouvillons (86). Le premier groupe, servant de contrôle, est nourri avec un mélange de foin et d'herbe. Pour le deuxième groupe, on remplace une partie de l'herbe par des débris de maïs contaminé avec 400 µg/g de FB₁ et 130 µg/g de FB₂.

Plus de 80 % des résidus de fumonisines B₁ et B₂ sont retrouvés non métabolisés dans les fèces; des traces sont retrouvées dans les urines. L'analyse *post-mortem* des tissus montre 2.070 ng/g de FB₁ dans le foie, 97,3 ng/g dans les muscles et 23,4 ng/g dans les reins.

Les fumonisines, élaborées par certaines espèces de *Fusarium* ont été détectées en tant que contaminants naturels dans diverses denrées alimentaires, principalement d'origine végétale.

On peut se demander quelle est la cause de la synthèse de ces mycotoxines ?

Quels sont les facteurs agissant sur cette synthèse ?

CHAPITRE 2

BIOSYNTHESE DES FUMONISINES

Le développement des techniques utilisant des molécules marquées au ^{14}C ou ^{13}C ont permis de comprendre la biosynthèse des mycotoxines.

En se basant sur les conditions naturelles de croissance du champignon, des expériences de laboratoire sont entreprises pour mettre en évidence les facteurs favorables à la synthèse de ces toxines.

2.1- Contamination fongique aux différents stades de développement d'un épi de maïs

La présence des différentes espèces de *Fusarium*, ainsi que la teneur en fumonisines évoluent tout au long de la maturité d'un épi de maïs. Une étude argentine a permis de suivre cette évolution (14). Des échantillons de maïs ont été analysés tous les 15 jours, à partir du 45^{ème} jour après la floraison jusqu'au stade de la récolte. Pour chaque groupe d'échantillons, on a déterminé les espèces présentes dans l'épi et la teneur en toxines. On récolte le maïs au 105^{ème} jour après la floraison; la maturité physique est obtenue après 60 jours.

Figure 3: Teneur en fumonisines aux différents stades de développement d'un épi de maïs

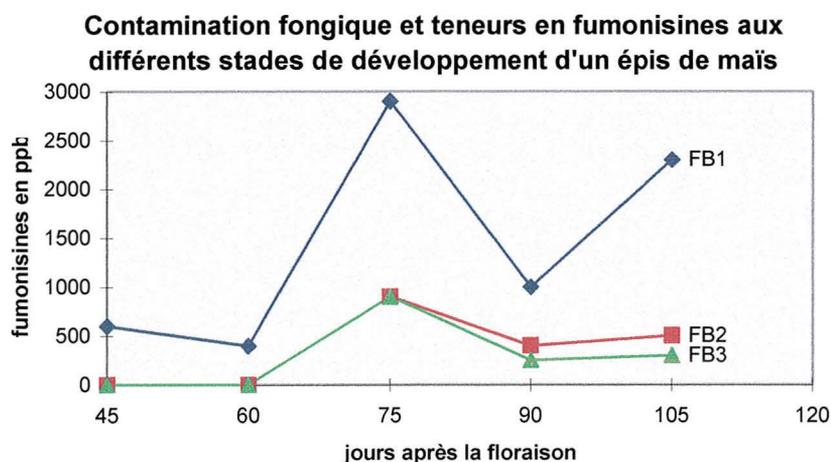
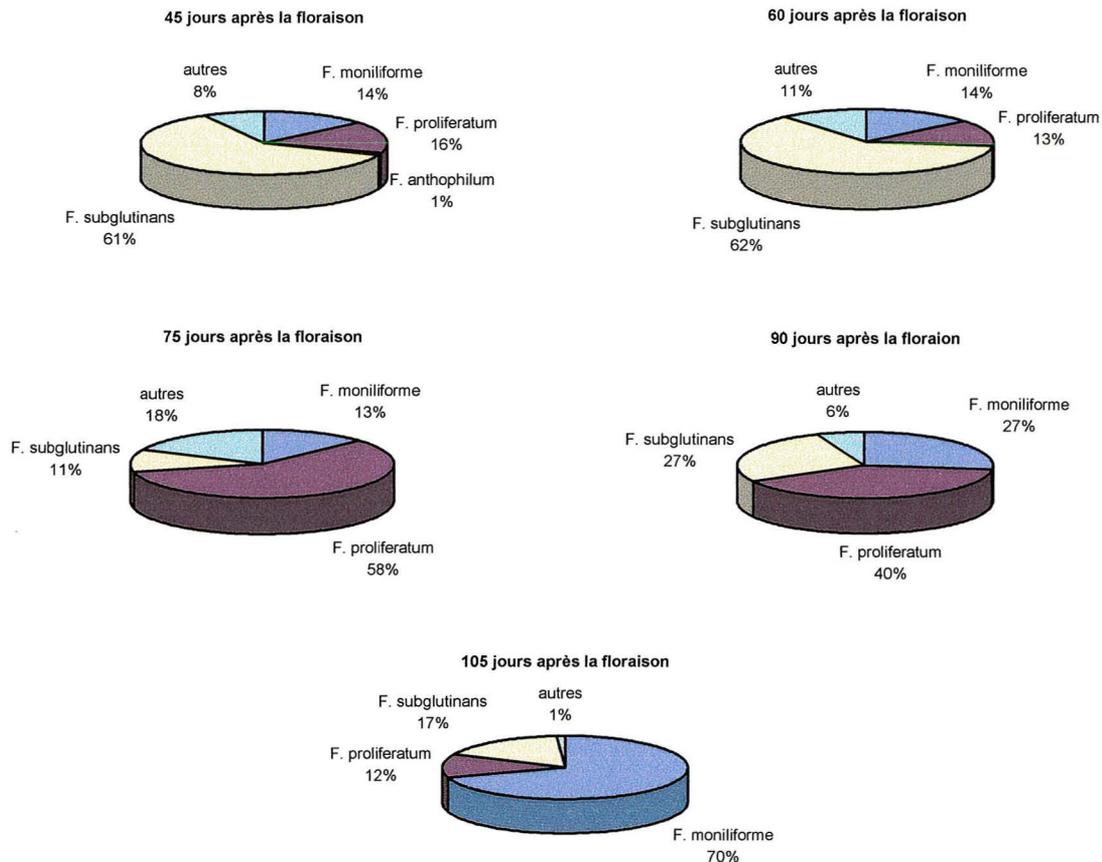


Figure 4: Contamination fongique aux différents stades de développement d'un épi de maïs



L'évolution de la contamination fongique aux différents stades de maturité du maïs montre que *F. subglutinans* est l'espèce prévalente pendant le premier stade (60 jours après la floraison), alors que *F. moniliforme* devient l'espèce majeure dans le dernier stade (90 jours après la floraison, jusqu'à la récolte). *F. proliferatum* est trouvé avec la plus haute fréquence dans le stade intermédiaire (75 à 90 jours après la floraison).

Il y a une bonne corrélation entre la contamination fongique et la teneur en fumonisines. En particulier, les taux élevés pour le stade intermédiaire et le dernier stade correspondent à la présence de *F. proliferatum* et *moniliforme*. D'un autre côté, dans la première période, les taux bas correspondent à la présence dominante de *F. subglutinans* qui n'est pas producteur de fumonisines. Mais cette espèce ne doit pas être négligée puisqu'on connaît sa capacité à synthétiser d'autres mycotoxines comme la moniliformine.

On peut noter que FB₂ et FB₃ ne sont détectées qu'à partir du 2^{ème} groupe d'échantillons. Cela suggère que ces toxines sont synthétisées à un stade plus avancé que FB₁.

2.2- Facteurs favorisant la synthèse des fumonisines

Des expériences de laboratoire ont permis de mettre en évidence les conditions favorables pour la toxinogénèse. Les milieux de culture solides ne sont pas favorables à l'étude de la biosynthèse des mycotoxines; par conséquent, on utilise en général des milieux de culture liquides (50). L'isolation et la purification des fumonisines sur un milieu liquide est beaucoup plus simple que l'isolation sur un milieu solide comme par exemple le maïs.

Comme les fumonisines sont solubles dans l'eau, on peut placer directement le milieu liquide dans une colonne échangeuse d'ions pour l'extraction des toxines.

Sur des milieux solides comme le maïs, les fumonisines apparaissent généralement 2 semaines après l'inoculation, et en fonction des conditions, continuent d'augmenter pendant au moins 4 semaines (30). La production de fumonisine diminue après 13 semaines. Sur les milieux liquides, les fumonisines peuvent apparaître dès le 3^{ème} jour.

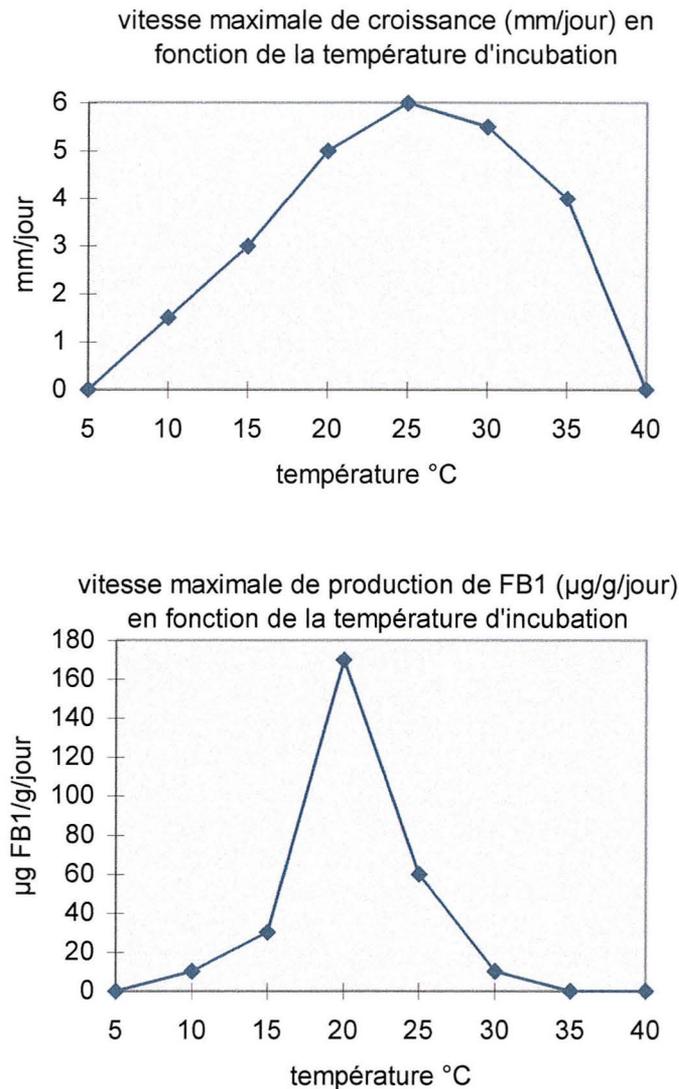
2.2.1- Influence de la température

Dans une étude, une des souches isolées de maïs ayant provoqué des cas de leucoencéphalomalacie équine estensemencée sur boîte de Pétri (34).

Les températures d'incubation sont les suivantes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40°C. La croissance est estimée quotidiennement par le rayon du thalle.

Cette même souche est cultivée en Erlenmeyer 100 ml sur des grains de maïs réhydratés (20g de maïs et 20 ml d'eau) et stérilisés. Au cours de l'incubation pendant 10 semaines, aux mêmes températures, un dosage de FB₁ est effectué. A partir des données concernant la croissance et la toxinogénèse, les vitesses maximales de croissance sont calculées pour chaque température.

Figure 5: Vitesse maximale de croissance en mm/jour et de production de FB₁ en µg/g/jour, en fonction de la température d'incubation.



La température minimale pour la croissance et la toxinogénèse est supérieure à 5°C; les températures maximales sont inférieures ou égales respectivement à 40 et 35°C.

La température optimale de toxinogénèse, 22°C, est légèrement inférieure à celle de la croissance du champignon.

En dehors de l'intervalle 15-27°C, la production de FB₁ est fortement réduite.

Différentes méthodes de séchage ont été étudiées dans les techniques de détection des fumonisines (48). La chaleur semble réduire la quantité de toxines: les concentrations

mesurées sont réduites de plus de 50 % quand le matériel de culture est chauffé à 50°C pendant une nuit (Tableau 8).

Tableau 8: Influence de la température et du temps de séchage sur la production de fumonisines en µg/g par une souche M-5991 de *F. proliferatum*

Fumonisine	23-25°C 48 heures	50°C 1 nuit
FB ₁	5.810	2.880
FB ₂	1.840	940
FB ₃	40	< 1

2.2.2- Influence de l'humidité

La production de fumonisines est très sensible à l'activité de l'eau (84). Quand l'activité de l'eau passe de 0,9 à 1 la production de toxines peut être augmentée d'un facteur 3.

Plusieurs études indiquent que les rendements maximums de fumonisines sont obtenus avec une humidité de 32 % (35).

On a vu que des quantités significatives de fumonisines sont produites dans la période qui précède la récolte du maïs. Pendant cette période les épis sont entassés dans les champs. S'il pleut, cela crée des conditions favorables pour la production de toxines (7).

2.2.3- Influence de l'aération

Dans une étude sur la production de fumonisines par *F. proliferatum*, on utilise des milieux de culture enfermés dans des sacs scellés 7 à 8 jours après l'inoculation fongique (48). Cette période permet au champignon de coloniser le maïs avant aération des sacs, celle-ci se faisant par une dizaine de trous en haut du sac. Si l'on pratique cette aération entre le 4^{ème} et le 10^{ème} jour après l'inoculation, les rendements de fumonisines ne sont pas affectés.

L'effet de l'aération sur la croissance de *F. proliferatum* et la production de FB₁ a été étudié en utilisant deux types d'expérience (31). Dans la première méthode, on utilise une flasque contenant le milieu de culture ventilée et une autre flasque non ventilée. On détermine chaque

jour la masse sèche, la concentration en glucose et l'accumulation de FB₁. Les résultats sont donnés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Effet de l'aération sur la croissance de *F. proliferatum* et la production de FB₁ au 20^{ème} jour (pH initial: 3,5)

	Glucose consommé en g/l	Masse sèche en g/l	FB ₁ en ppm
Flasque ventilée	90,2	13,2	201
Flasque non ventilée	121	11,2	10,5

La croissance du champignon et la toxinogénèse sont plus importantes dans la flasque ventilée. En revanche, la quantité de glucose consommé est plus importante dans la flasque non ventilée.

Dans la seconde méthode, l'aération est contrôlée en couvrant la flasque par une couche de parafilm. La flasque servant de contrôle n'est pas couverte.

Tableau 10: Effet de la restriction d'oxygène sur la croissance de *F. proliferatum* et la production de FB₁ au 20^{ème} jour de culture

	Glucose consommé en g/l	Masse sèche en g/l	FB ₁ en ppm
Flasque contrôle	68	14,1	533
Flasque couverte	100,9	4,3	non détecté

Les résultats montrent que la croissance et la production de fumonisines sont plus importantes quand il n'y a pas restriction de l'aération. De même, lorsque la quantité d'oxygène est réduite, la consommation de glucose augmente. Cette augmentation indique que le métabolisme est altéré mais non stoppé par la baisse du niveau d'oxygène. En dessous d'une teneur limite en

oxygène, il est possible que la respiration soit limitée et que le catabolisme du glucose *via* la glycolyse soit augmenté.

L'utilisation de bioréacteurs permet de mesurer le niveau d'oxygène au fur et à mesure que la culture se développe. Il semble que la demande en oxygène augmente dans les deux premiers jours de la croissance. Puis, lorsque la croissance atteint une phase stationnaire, le taux d'oxygène n'apparaît plus aussi important.

2.2.4- Influence du pH

Tableau 11: Effets du pH initial sur la croissance de *F. proliferatum* et la production de FB₁ dans des flasques au 20^{ème} jour de culture (31)

PH initial	Glucose consommé en g/l	Masse sèche en g/l	FB ₁ en ppm
2,2	27,5	11,7	9,4
2,6	39,2	11,1	33,3
3	44,7	12	261,6
3,7	89,3	13,8	436,7
4,2	90,1	16,7	432,3
5,6	94,1	24,4	16,9

Le tableau 11 montre l'estimation de la masse sèche, reflétant la croissance fongique, le glucose consommé, et la quantité de FB₁ accumulée après 20 jours à différents pH initiaux.

La croissance du champignon est la plus importante au pH initial le plus élevé (5,6), elle diminue quand ce pH est plus bas.

A pH5, *F. proliferatum* croit normalement mais produit peu de fumonisines (moins de 100 µg/g). A un pH inférieur à 5, la croissance est ralentie mais la toxinogénèse augmente.

Les plus grandes quantités de FB₁ sont produites quand le pH initial se situe entre 3,7 et 4,2.

A un pH inférieur à 2,5, la croissance du champignon et la toxinogénèse sont faibles.

2.2.5- Présence d'autres espèces fongiques

Les espèces de *Fusarium* ne colonisent pas le maïs isolément . Pour se développer, elles doivent rivaliser avec d'autres colonisateurs dont différentes espèces d'*Aspergillus*. En 1988, Wicklow et coll. (42), trouvent une corrélation négative entre *A. flavus* et *F. moniliforme* dans des études mises en œuvre avant que les fumonisines ne soient découvertes. Plus récemment, Yoshizawa et coll., reportent une relation négative entre aflatoxine et fumonisine dans des échantillons de maïs thaïlandais.

En 1998, Marin et coll. démontrent pour la première fois la compétition entre les souches de *F. moniliforme* et *F. proliferatum*, et une série d'autres espèces en faisant varier les conditions environnementales *in vitro*.

La croissance des deux espèces de *Fusarium* sur des couches de grains de maïs augmente avec l'activité de l'eau (0,93; 0,95 et 0,98) et la température (15 et 25°C).

L'interaction entre les deux espèces de *Fusarium* et les autres espèces résulte en une inhibition de contact mutuelle et une inhibition de la croissance par les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, indépendamment de l'activité de l'eau et de la température.

A 25°C, *A. flavus* et *A. niger* Van Tieghen réduisent l'infection des grains de maïs par les espèces de *Fusarium* de plus de 45 et 30% respectivement après deux semaines.

A 15°C et à des faibles niveaux d'activité de l'eau, l'infection est réduite et parfois complètement inhibée par *A. niger*, *A. ochraceus* Wilhelm et *P. implicatum* Biourge. Cependant, ces interactions influencent parfois de façon positive la production de fumonisines.

L'interaction avec *A. niger*, *A. ochraceus* et *A. flavus* à 15 et 25°C et à une activité de l'eau de 0,98 résulte en une stimulation significative de la production de fumonisines par les deux espèces de *Fusarium*. En revanche, l'interaction avec *P. implicatum* résulte en une diminution de la production de fumonisines.

2.2.6- Influence de l'acide propionique

Les effets de l'acide propionique, du propionate de sodium, ainsi que leur mélange, sur la croissance de *F. proliferatum* et la synthèse de FB₁ ont été évalués à différents taux d'humidité et températures (74). Les doses utilisées étant 0,03, 0,05 et 0,07 %. *F. proliferatum* se développe quelles que soient l'activité de l'eau et la température. Cependant, en présence de 0,07 % de propionate, la croissance est limitée à un taux d'humidité de 98%.

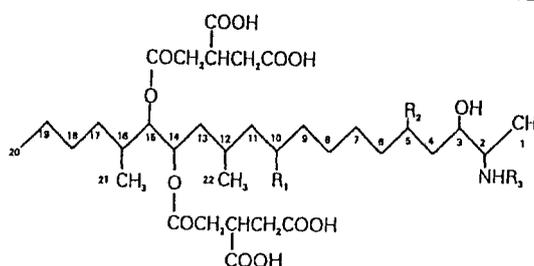
L'inhibition de la croissance est maximale quand les propionates sont utilisés sous forme acide.

En présence de faibles quantités de propionate de sodium (0,03 %), la croissance est parfois améliorée, ceci étant probablement dû à l'assimilation de ces composés par le champignon.

2.3- Biosynthèse

2.3.1- Formules chimiques

FUMONISINS			
	R ₁	R ₂	R ₃
FA ₁	OH	OH	CH ₂ CO
FA ₂	H	OH	CH ₂ CO
FB ₁	OH	OH	H
FB ₂	H	OH	H
FB ₃	OH	H	H
FB ₄	H	H	H



2.3.2- Synthèse

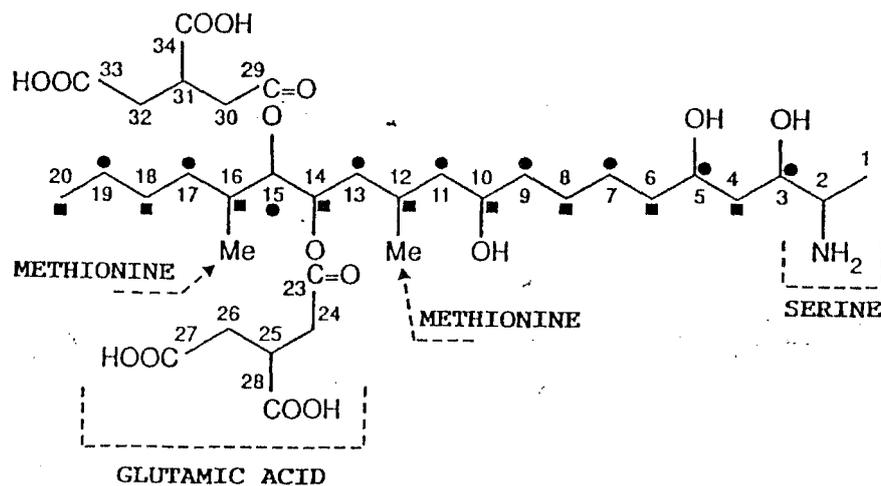
L'utilisation de précurseurs marqués au ¹⁴C et ¹³C est une approche expérimentale majeure pour l'identification des intermédiaires dans la biosynthèse des fumonisines. Ces précurseurs doivent être ajoutés fréquemment dès les premiers temps de la fermentation pour obtenir le maximum d'incorporation. On les introduit entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour, et les toxines sont dosées 3 jours plus tard.

Une méthode pour la production et la purification de fumonisines marquées implique l'addition d'acide acétique marqué au ¹⁴C dans le liquide de culture de *F. moniliforme* (8).

On utilise également des isotopes stables marqués au ¹³C de plusieurs acides aminés afin de déterminer la localisation des atomes de carbone dans les fumonisines produites.

Ces études montrent que le ¹⁴C est distribué dans toute la molécule; les tests au ¹³C indiquent que la biosynthèse implique l'addition de méthionine, d'acide glutamique et de sérine ou d'alanine à la structure de base hydrocarbonée.

Figure 6: Schéma montrant l'incorporation des précurseurs marqués au ^{13}C dans la molécule de FB₁. Les symboles ■ et ● correspondent respectivement aux groupements CH₃ et COOH de l'acide acétique.



Le marquage du groupe CH₃ de l'acide acétique conduit à l'enrichissement des carbones 20, 18, 16, 14, 12, 8, 6 et 4 alors que le groupement COOH de l'acide acétique enrichit les carbones 19, 17, 15, 13, 11, 9, 7, 5 et 3 des fumonisines.

On peut noter qu'il n'y a pas d'incorporation correspondant au carbone 1 et au carbone 2 qui forment le groupe amino terminal de ces toxines. C'est le cas également des groupes méthyle correspondant aux carbones 21 et 22.

Quand on additionne de l'acide acétique marqué au ^{13}C , on obtient une faible incorporation du carbone du groupement COOH dans les trois carboxyl libres des fonctions ester des fumonisines. Par contre, le carbone du groupement CH₃ de l'acide acétique enrichit les positions 24 à 26 et 30 à 32 des fonctions ester.

Quand on incorpore de la méthionine marquée au ^{13}C , le groupement S-CH₃ enrichit exclusivement les carbones 21 et 22. Il faut noter que cette incorporation est plus importante que celles obtenues avec les autres acides aminés marqués.

Les groupements carboxyle terminaux des fumonisines (carbones 23, 27, 29 et 33) proviennent de l'acide glutamique. En revanche, les carbones 28 et 34 ne proviennent pas de l'acide glutamique, mais seraient dérivés de l'acétyl Coenzyme A par un mécanisme de condensation (8).

L'addition de sérine ou d'alanine marquées au ^{13}C conduit à une très faible incorporation de radioactivité dans la molécule de fumonisine; il semble cependant que ces deux acides aminés soient à l'origine du groupe amino terminal et du carbone 1.

Avant cette étude, on se demandait si les fumonisines étaient d'origine lipidique ou polyacétoacidique. Dans cette étude réalisée par Blackwell et coll. en 1994, le développement du champignon, et par conséquent la production de lipides, deviennent maximum au 3^{ème} jour, alors que l'addition de précurseurs marqués commence seulement au 7^{ème} jour. Il est peu probable que la chaîne carbonée des fumonisines reçoive un tel enrichissement si ces toxines étaient dérivées des lipides. Les études entreprises ultérieurement sont en accord avec ces premiers résultats (88). Toutefois, on ne connaît pas encore toutes les étapes de la synthèse des fumonisines, certaines étant encore hypothétiques et sont à confirmer.

On sait que la fréquence et la capacité de production de FB_1 sont très élevées. Cette production dépend de facteurs environnementaux telles la disponibilité en eau et en oxygène ainsi que la température.

En ce qui concerne les souches fraîchement isolées, elles présentent un taux de synthèse de fumonisines généralement supérieur par rapport à celles conservées depuis quelques années (34). En effet, ces dernières sont souvent peu toxigènes, cela pouvant s'expliquer par une perte progressive du pouvoir toxigène au cours de repiquages successifs.

Quoi qu'il en soit, plus de 50 % des souches peuvent être considérées comme potentiellement dangereuses dans les conditions naturelles.

Lorsque ces toxines sont accidentellement absorbées par l'animal ou par l'homme, elles subissent une métabolisation et provoquent un certain nombre d'effets toxiques. Cela va être l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 3

METABOLISME ET STABILITE DES FUMONISINES

L'étude de l'absorption, de la distribution tissulaire et de l'excrétion des fumonisines chez diverses espèces animales ont permis de comprendre les effets toxiques provoqués par ces métabolites fongiques au niveau de certains organes.

Ces études du métabolisme se basent sur des observations faites lors d'intoxications naturelles chez l'animal et parfois chez l'homme, mais surtout sur des observations faites lors d'intoxications expérimentales chez l'animal pour ensuite extrapoler ces résultats à l'homme.

3.1- Métabolisme

3.1.1- Absorption

Les fumonisines sont des métabolites fongiques contaminants naturels de l'alimentation animale et humaine. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, ce sont les produits issus du maïs qui sont les plus touchés.

Chez les espèces d'élevage, comme chez l'homme, l'absorption gastro-intestinale est le premier événement régissant l'entrée des mycotoxines dans le sang et au-delà, vers l'ensemble des tissus de l'organisme.

3.1.2- Distribution tissulaire et excrétion

3.1.2.1- Etudes chez le rat

La FB₁ marquée au ¹⁴C à partir de culture de *F. moniliforme* (52) a été administrée à des rats par voie orale ou intraveineuse. On retrouve, intacte dans les fèces, plus de 80% de la dose orale et plus de 35% de la dose administrée par voie intraveineuse, ce qui montre qu'une fois absorbées, ces toxines sont rapidement éliminées. L'excrétion rénale représente respectivement 3 et 10% des doses orale et intraveineuse. Les toxines marquées sont rapidement éliminées du sang après administration intraveineuse avec une clairance de 90 et 95 % respectivement après 10 et 30 minutes.

La plupart des tissus et des organes ne semblent pas retenir les fumonisines; cependant les organes cibles (foie et reins) montrent des quantités non négligeables de radioactivité. 96 heures après administration orale, le foie et les reins retiennent respectivement 0,4 % et 0,2 % de FB₁. Après administration intraveineuse, le foie retient 30 % de la dose et les reins 8 %; ces niveaux restent élevés, leur présence étant détectée 96 heures après l'administration.

Une autre étude a consisté à administrer à des rats, par voie intrapéritonéale, une dose de FB₁ de 7,5 mg/kg de poids corporel (83). FB₁ est rapidement absorbée et atteint une concentration

plasmatique maximale, 20 minutes après l'injection. Ensuite, elle est rapidement épurée du plasma, sa demie-vie étant de 18 minutes.

Des échantillons d'urine collectée à 24 et 48 heures indiquent que seulement 16 % de la dose est retrouvée non métabolisée dans les urines, dans les premières 24 heures suivant l'injection. Si une dose similaire de FB₁ est donnée par voie orale, on n'en retrouve que 0,4 % dans les urines.

3.1.2.2- Etude chez le boeuf

Nous avons déjà vu le résultat de cette étude dans le chapitre 1 (86).

Après avoir nourri pendant 30 jours des bouvillons avec une ration contenant des débris de maïs contaminés avec 400 µg/g de FB₁ et 130 µg/g de FB₂, plus de 80 % des résidus de fumonisines sont retrouvés non métabolisés dans les fèces. Des traces sont retrouvées dans les urines. L'analyse *post-mortem* des tissus montre 2.070 ng/g de FB₁ dans le foie, 97,3 ng/g dans les muscles et 23,4 ng/g dans les reins.

3.1.2.3- Etude chez le singe

En 1999, Shepard et coll. ont administré de la FB₂ à des singes par voie orale ou intraveineuse (81). FB₂ est rapidement éliminée du plasma avec une demie-vie de 18 minutes après administration intraveineuse de 2 mg/kg de poids corporel de FB₂.

Deux singes sont nourris par gavage avec une dose unique de 7,5 mg/kg de poids corporel de FB₂. Un seul singe montre des niveaux détectables de fumonisines dans le plasma (25-40 ng/ml dans les 3 à 5 heures après administration). Cela indique que FB₂ a une faible biodisponibilité comme c'est le cas également pour FB₁.

L'excrétion urinaire de FB₂ est très faible, même après une administration intraveineuse. En moyenne, 4,1 et 0,2% respectivement des doses intraveineuse et orale sont retrouvées dans les urines après une période de 7 jours.

Les fèces représentent la principale voie d'excrétion, la majeure partie de FB₂ étant retrouvée non métabolisée. Des dérivés partiellement hydrolysés sont retrouvés en faible quantité (6-7 %), avec un maximum de 1,1% de dérivés entièrement hydrolysés.

3.1.2.4- Etude chez le porc

Des porcs ont été nourris pendant 24 heures avec une ration contenant 2 à 3 ppm de FB₁ marquée (21). Les tissus hépatiques et rénaux montrent un niveau de radioactivité respectivement de 160 et 65 équivalents ppb de FB₁. Mais, si après cette dose, on nourrit les porcs avec une ration saine, les niveaux de radioactivité tissulaire décroissent rapidement au cours des 9 jours suivants.

En conclusion, les fumonisines sont pauvrement absorbées. Elles ont une biodisponibilité faible ne dépassant pas 6% (21). Leur demie-vie étant courte, ces mycotoxines sont rapidement éliminées, majoritairement non métabolisées.

Il y a très peu de résidus dans les tissus animaux comme le lait ou les muscles. Les fumonisines persistent en faibles quantités dans le foie et les reins où elles vont exercer leur action toxique.

3.2- Stabilité

Les fumonisines sont des contaminants naturels de denrées alimentaires. Des études sur la stabilité de ces toxines ont été entreprises afin de déterminer des procédés efficaces de décontamination de ces produits. De tels procédés permettraient de limiter l'absorption de ces toxines. Mais, ils aboutissent parfois à la formation de dérivés également toxiques.

3.2.1- Effets des traitements physiques

3.2.1.1- Lavage et ébullition

Le lavage du maïs contaminé avec de l'eau claire n'a pas réduit les niveaux de contamination. C'est le cas également pour une culture fongique de *F. moniliforme* qui a été portée à ébullition pendant 30 minutes puis séchée à 60 °C pendant 24 heures (77).

3.2.1.2- Température

Les effets de la température sur la stabilité de FB₁ et FB₂ sont déterminés dans une solution tampon (28). Les paramètres étudiés incluent la durée (0-60 minutes), la température (100-235°C), et le pH (4,7 et 10). Les auteurs ont montré que la décomposition des toxines augmente avec la température; moins de 27 et 20% respectivement de FB₁ et FB₂ se décomposent quand la température est inférieure ou égale à 125°C pendant 60 minutes. Après

60 minutes à 150°C, les pertes de FB₁ et FB₂ sont égales à 80-90 % à pH 4, 18-30 % à pH 7 et 40-52 % à pH10; à température supérieure ou égale à 175°C, plus de 80 % de FB₁ et FB₂ se décomposent après 60 minutes.

Cette étude montre, que lors des procédés de cuisson des aliments contenant du maïs infecté, la température doit atteindre au moins 150°C pour réduire de façon significative les niveaux de fumonisines.

Quand les aliments sont préparés par ébullition, la température n'excède pas 100°C. Les températures comprises entre 150 et 200°C sont utilisées lors de la cuisson au four ou lors de la friture des denrées (29).

3.2.1.3-Irradiation *gamma*

L'effet d'une irradiation *gamma* sur FB₁ et FB₂ a été évalué avec du maïs contaminé et irradié, placé à différentes températures (-18 à 24°C) pendant une durée variant de 2 à 26 semaines (100). Ce procédé ne réduit le taux de fumonisines que de 20%. Ces toxines restent stables dans le maïs irradié pendant au moins 6 mois à 25°C et au moins 4 semaines à 40°C. Cette étude montre que l'irradiation *gamma* n'est pas une méthode appropriée pour la stérilisation du maïs.

3.2.2- Effets des traitements chimiques

3.2.2.1- Ammoniaque

L'ammoniaque est utilisé pour détoxifier le maïs contenant des aflatoxines (51). On a donc chercher les effets de l'ammoniaque sur du maïs naturellement contaminé, ou cultivé avec des souches de *F. moniliforme*.

Les niveaux de FB₁ dans les cultures fongiques et dans le maïs naturellement contaminé sont réduits de 30 et 45% respectivement par le traitement à l'ammoniaque à pression atmosphérique ambiante. Sous haute pression, l'ammoniaque réduit le taux de FB₁ de 79% (77).

Cependant, malgré la réduction des taux de fumonisines, la toxicité des cultures fongiques données à des rats n'est pas diminuée par l'ammoniation. La réduction de la prise de poids, l'élévation des enzymes sériques et les lésions histopathologiques typiques de la toxicité de *F. moniliforme* apparaissent chez les rats traités. En conséquence, le traitement par l'ammoniaque n'est pas efficace pour la détoxification du maïs contaminé par *F. moniliforme*.

3.2.2.2- pH

Diverses solutions aqueuses acides ou basiques contenant 100 ppm de FB₁ ont été préparées avec SO₂, NaHCO₃ et Na₂CO₃ (28). Ces solutions ont été chauffées à 60°C pendant 7 jours, des dosages journaliers de FB₁ étant réalisés. FB₁ est stable à la fois dans la solution de SO₂ et de NaHCO₃, alors qu'elle se décompose dans la solution de Na₂CO₃. Dans ce cas, on observe une augmentation progressive du dérivé hydrolysé de FB₁.

FB₁ est stable en milieu neutre, relativement stable en milieu légèrement acide et légèrement basique, alors qu'elle est hydrolysée en milieu à pH fortement basique (hydroxyde de potassium 0,05 - 2 M) en aminopentol (AP₁) qui est également toxique (78). Il est important de souligner que les tampons utilisés pour préparer le pain et les gâteaux à base de maïs sont généralement neutres (29).

Les fumonisines sont des composés stables et leur décomposition nécessite des températures élevées et des temps de chauffe relativement longs. Or, ces températures ne sont pas toujours atteintes lors de la fabrication de denrées alimentaires à base de maïs. Le procédé de nixtamalisation (cuisson de la pâte de maïs avec de l'hydroxyde de calcium) réduit les concentrations de fumonisines mais les produits de dégradation conservent leur toxicité (46). Une variante de la nixtamalisation consistant à rajouter H₂O₂ à NaHCO₂, donne 100 % de réduction de FB₁ (54). Si on chauffe le maïs contaminé avec des sucres réducteurs comme le glucose ou le fructose, la toxicité diminue du fait de la formation de bases de Schiff, composés moins toxiques (46). Des études ont été entreprises afin de trouver d'autres procédés qui pourraient réduire le risque de toxicité.

Dix échantillons de maïs sélectionnés au hasard dans une cargaison d'Afrique du Sud étaient caractérisés par une large distribution de la taille des grains (93). On a séparé les grains avec un tamis retenant ceux de plus de 3 mm. Ces grains représentaient 80 à 95,3% des échantillons et étaient contaminés par des taux de fumonisines totales compris entre 530 et 1.890 ng/g. Les fines particules inférieures à 3 mm, contenaient des concentrations de fumonisines nettement plus élevées, comprises entre 1.234 et 2.746 ng/g, et représentaient 4,7 à 20 % des échantillons.

Cette étude montre qu'un retrait initial des fines particules des cargaisons de maïs, avant d'autres traitements, pourrait être un procédé préliminaire de décontamination.

On s'est intéressé également au rôle que pourrait jouer le charbon actif puisqu'il a été démontré qu'il avait une haute affinité *in vitro* pour FB₁ (87). Dans cette étude, des rats ont

consommé une ration contenant jusqu'à 4 mg/kg d'un mélange FB₁ + FB₂ avec ou sans 2% de charbon actif. Chaque type de ration est donné aux rats, pendant une semaine. Des échantillons d'urine sont collectés à la fin de la semaine; après sacrifice, on pèse le foie de chaque animal. L'augmentation de la concentration de sphinganine ou du ratio sphinganine/sphingosine dans les tissus ou les fluides biologiques est un biomarqueur de l'ingestion de fumonisines. Nous étudierons ce mécanisme dans le chapitre 5. On utilise également ce biomarqueur pour évaluer l'efficacité du charbon actif pour empêcher l'absorption intestinale de fumonisines chez ces rats. Les rats exposés à une ration contaminée montrent une augmentation significative de la sphinganine hépatique ainsi que du poids du foie en comparaison avec les rats témoins.

La concentration moyenne de sphinganine dans le foie des rats exposés à la ration fumonisines + charbon actif est plus faible que celle des rats nourris avec seulement des fumonisines. Mais cette différence n'est pas significative. Par contre, l'addition du charbon actif réduit efficacement l'augmentation du poids du foie causée par ces mycotoxines.

Cette étude montre l'affinité *in vivo* du charbon actif pour FB₁. L'addition de ce composé aux aliments contaminés par *F. moniliforme* pourrait réduire l'absorption intestinale de fumonisines.

En conclusion, les études entreprises sur le métabolisme des fumonisines ont permis de comprendre comment ces toxines manifestent leurs effets au niveau de certains organes.

Les fumonisines sont absorbées par voie orale, franchissent le tractus gastro-intestinal et sont éliminées en grande partie dans les fèces. Certains organes, en particulier certains organes vitaux comme le foie ou les reins, renferment ces toxines à différents taux de concentration.

L'absorption de ces toxines est due à leur présence dans certaines denrées alimentaires. Or, ce sont des composés stables et des études ultérieures seront nécessaires pour mettre en place des procédés fiables de détoxification des aliments.

Diverses techniques permettent de détecter une mycotoxine dans une denrée alimentaire, de l'analyser et de la doser, et ceci à des concentrations faibles.

Nous allons maintenant étudier les principales méthodes de dosage et aussi les méthodes de détection rapide ou "screening" permettant non seulement de savoir si un aliment est contaminé, mais aussi de détecter rapidement si une souche fongique est toxigène ou non.

CHAPITRE 4

TECHNIQUES DE DOSAGE DES FUMONISINES

Les effets toxiques des fumonisines s'exercent en quantités faibles (10µg/g) dans les denrées alimentaires (82). Leur identification et leur dosage font appel à des méthodes d'échantillonnage, de préparation des échantillons, d'extraction et d'analyse. Ces méthodes analytiques doivent être simples, rapides, sensibles et économiques, et se basent principalement sur les propriétés physiques et chimiques des fumonisines. De plus, des méthodes de screening ont été établies; elles ont pour but, dans un délai relativement court, de détecter la production ou non de toxines par des souches fongiques, ainsi que leur présence ou non dans des denrées alimentaires.

4.1- Propriétés physiques et chimiques des fumonisines (50, 92)

Fumonisine	Formule moléculaire	Masse moléculaire relative	Absorption dans l'UV et émission de fluorescence	Solubilité
B ₁	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721	Néant	Solubles dans l'eau et les solvants polaires (méthanol, acétonitrile)
B ₂	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705	Néant	Insolubles dans le chloroforme et autres solvants organiques

4.2- Techniques de dosage des fumonisines

La technique de dosage la plus couramment employée est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), couplée à un détecteur électrochimique, un détecteur à diffusion de lumière ou un spectrofluorimètre. Du fait de leurs propriétés physiques (absence d'absorption dans l'UV et de fluorescence), les fumonisines subissent une réaction de dérivation aboutissant à la formation d'un dérivé fluorescent, cette réaction se faisant après extraction et purification. Plusieurs réactifs peuvent être employés (Tableau 12). L'intensité de la fluorescence doit être stable afin de permettre une détection optimale des toxines présentes dans l'échantillon analysé. La fonction NH₂ des fumonisines se couple avec le réactif. Pour éviter les

interférences dues aux fonctions amines libres des substances parasites de l'échantillon, l'extrait est purifié avant dérivation et analyse.

Tableau 12- Dérivés fluorescents formés pour le dosage par CLHP

Dérivé formé	Remarque	Absorption	Emission de fluorescence	Références
o-phthaldialdéhyde (OPA) en présence de 2-mercaptoéthanol	Technique la plus employée L'intensité de la fluorescence décroît rapidement. Le dérivé doit être injecté en CLHP dans la minute suivant sa formation	335 nm 229 nm	440 nm 442 nm	58, 90 94
OPA en présence de tert-butylthiol (2-méthyl-2-propanethiol)	Le dérivé est stable pendant plus de 4 heures	345 nm	435 nm	27
naphalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA) en présence de KCN	L'intensité de la fluorescence est intense et plus stable que pour le dérivé OPA	420 nm	500 nm	5
fluorescamine	Même sensibilité que pour le dérivé OPA Ce dérivé est plus stable	390 nm	475 nm	104, 77, 79

Par contre, l'utilisation d'un détecteur à diffusion de lumière ne nécessite pas la formation d'un dérivé fluorescent (102).

On distingue le dosage de solutions standards de fumonisines de celui de denrées alimentaires contaminées. Dans ce deuxième cas, on doit utiliser un gradient de phase mobile afin de séparer les fumonisines des substances parasites présentes dans l'échantillon, ainsi que les différentes fumonisines.

Tableau 13- Matériel utilisé pour la CLHP

Echantillon	Colonne	Phase mobile	Détection	Références
Solution standard de FB ₁	Gel de silice C ₁₈ (5µm)	Acétonitrile/KH ₂ PO ₄ (45/55, pH 7)	fluorescence ou électrochimique	27
Solution standard de FB ₁	Gel ODS C ₁₈ (5µm)	Méthanol/0,1M NaH ₂ PO ₄ (75/25, pH 3,35)	fluorescence	90, 18
Solutions standards de FB ₁ , FB ₂ , FB ₃	Gel C ₁₈ (5µm)	Acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique Gradient de (5/95/0,025) à (90/10/0,025)	diffusion de lumière	102
Maïs Nourriture pour animaux	Gel de silice C ₁₈ (5µm)	Acétonitrile/eau/ acide acétique Gradient de (40/59/1) à (60/39/1)	fluorescence	94 , 5, 104, 77
Poussière de maïs	LC-18 (5mm)	Méthanol/0,05M KCl (10/90)	fluorescence	79
Maïs Autres céréales (blé, riz, mixtes)	Gel ODS C18 (5µm)	Méthanol/0,1M NaH ₂ PO ₄ (75/25, pH3,35)	fluorescence	58, 4, 97, 18, 99, 29, 14

La CLHP est couplée à d'autres méthodes de dosage quantitatives:

- chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse
- chromatographie en couche mince (CCM)

ou semi- quantitatives:

- les techniques immunologiques (ELISA)

- Ces dernières années, on a vu le développement de techniques rapides et peu coûteuses pour une détection semi-quantitative des fumonisines dans les céréales: les tests ELISA. Ces techniques permettent de détecter des traces de toxines dans les échantillons (106) lorsque les méthodes chromatographiques sont difficiles à mettre en œuvre.

Des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques des fumonisines ont été produits. La fonction NH₂ est un épitope présentant une haute affinité pour les anticorps. La spécificité de la méthode permet de limiter les étapes de purification de l'échantillon (89). Il n'y a pas de réaction croisée avec les sphingolipides ou avec d'autres mycotoxines telles que l'aflatoxine B₁, l'ochratoxine A, la zéaralenone ou la toxine T2 (106). Cependant, s'il y a une bonne corrélation entre les résultats obtenus avec les tests ELISA et les techniques chromatographiques pour des solutions standards de fumonisines (58), concernant les échantillons de maïs naturellement contaminés, les dosages obtenus par ELISA conduisent toujours à des surévaluations. Ces méthodes donnent de faux positifs car les anticorps peuvent réagir avec des molécules proches de FB₁ (autres analogues, précurseurs ou métabolites sécrétés par le champignon). Les réactions croisées avec FB₂ et FB₃ sont respectivement de l'ordre de 38 et 33% avec des anticorps monoclonaux, et 24 et 30% respectivement avec des anticorps polyclonaux (91).

Ces méthodes sont rapides et pratiques; des kits ont été mis sur le marché afin de permettre aux agriculteurs de surveiller leur production. Cependant, des méthodes chromatographiques doivent être couplées à cette méthode pour confirmer et affiner les dosages des fumonisines dans les denrées alimentaires.

- La CCM permet la détection de fumonisines dans des échantillons ainsi qu'un dosage par comparaison avec des solutions standards de concentration connue. C'est une méthode simple et peu coûteuse (Tableau 14).

Les limites de détection varient en fonction des techniques appliquées. Elles sont en général plus basses pour des solutions standards que pour des échantillons de denrées alimentaires (Tableau 15).

Tableau 14- Matériel utilisé pour le dosage par chromatographie en couche mince

Solvant	Révélateur	Coloration	Références
Chloroforme/méthanol/ acide acétique (60/30/10)	P. anisaldéhyde 5,5% dans méthanol/ac. sulfurique/ ac. acétique (90/5/5)	rouge violet après chauffage à 100°C pendant 5 minutes	104, 77, 8
Chloroforme/méthanol/ acide acétique (60/30/10)	fluorescamine 1% dans l'acétone	jaune fluorescent après chauffage à 110°C pendant 5 minutes	79
Méthanol/KCl (3/2)	fluorescamine dans CH ₃ CN puis CH ₃ CN/ac. borique (4/6)	jaune vert sous lampe UV après séchage à l'air	79
Butanol/acétonitrile/eau (20/10/10) puis Chloroforme/méthanol/eau /acide acétique (55/26/8/1)	p.anisaldéhyde	N.I.* chauffage à 100°C pendant 10 minutes	35
Acétonitrile/eau (85/15)	p.anisaldéhyde	N.I.* chauffage à 140°C pendant 3 à 5 minutes	49, 15

*N.I.: non indiqué

Tableau 15- Limites de détection des diverses techniques employées

Echantillon	Technique de dosage	Limite de détection
Solutions standards	CLHP avec spectrofluorimètre	10 à 30 ng/ml
	avec détecteur électrochimique	250 ng/ml
	avec détecteur à diffusion de lumière	6 ng/ml
	CCM	10 à 50 µg/ml
	ELISA	0,05 ng/ml
Maïs Nourriture pour animaux	CLHP avec spectrofluorimètre	20 à 50 ng/g
	CCM	300 à 400 µg/g
	Chromatographie gazeuse	100 ng/g
	ELISA	5 ng/g

Des méthodes simples, rapides et efficaces d'analyse des fumonisines sont nécessaires et des progrès ont déjà été réalisés en vue de leur développement. Si la CLHP reste la méthode la plus utilisée du fait de sa sensibilité et de sa précision, l'emploi de méthodes immunologiques pouvant être mises en œuvre par des opérateurs peu qualifiés, et d'un coût généralement plus faible, permet d'étendre le contrôle des denrées alimentaires. Les études s'orientent vers la mise au point de techniques d'analyse efficaces et peu coûteuses pouvant être utilisées par les laboratoires des pays en voie de développement. La présence de faibles doses de mycotoxines dans l'alimentation suffit pour induire chez l'animal des effets toxiques aigus ou chroniques. C'est l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 5

EFFETS TOXIQUES DES FUMONISINES

Depuis la découverte des fumonisines en 1988, de nombreuses recherches se sont orientées sur les effets de ces mycotoxines chez divers animaux lors d'intoxications naturelles, mais surtout lors d'expériences en laboratoire. Ces études ont permis de connaître les effets biochimiques et le mode d'action de ces toxines et ainsi, d'expliquer les effets toxiques qui en découlent. Elles ont également permis de connaître les doses susceptibles d'entraîner une toxicité aiguë ou chronique. Enfin, on étudie également le rôle que pourraient tenir les fumonisines dans certaines maladies humaines.

5.1- Effets des fumonisines chez l'animal

Les symptômes d'intoxication par les fumonisines ont été étudiés, soit lors d'intoxications naturelles, soit en laboratoire à la suite d'ingestion d'aliments contaminés, ou à la suite d'injection de FB₁ purifiée.

5.1.1- Intoxication naturelle

Une maladie létale touchant des troupeaux de chevaux apparaît pour la première fois aux Etats-Unis en 1850. On la décrit comme un empoisonnement du bétail par du maïs moisi, "moldy corn disease". On rapporte plusieurs cas pendant la première moitié du 20^{ème} siècle, et en 1971 Wilson et Marompot établissent que *F. moniliforme* est l'agent responsable de ce désordre nerveux des chevaux (10), en montrant que ce champignon est le contaminant principal du maïs moisi.

Une fois les caractéristiques cliniques et morphologiques de cette maladie connues, le nom de ce syndrome évolue en leucoencéphalomalacie équine (50). Cette maladie se développe en général après une période de plusieurs jours à plusieurs semaines pendant laquelle le cheval devient mou, désorienté et refuse de s'alimenter. Les symptômes progressent vers une ataxie*, une transpiration abondante, des convulsions et finalement la mort de l'animal. L'examen anatomo-pathologique de l'encéphale montre des zones de dégénérescence multifocales de la substance blanche cérébrale.

Cette maladie devient préoccupante à la fin des années 80 aux Etats-Unis; durant l'automne 1989 et l'hiver 1990, les services vétérinaires reçoivent de nombreux rapports de leucoencéphalomalacie équine de différents états.

On recueille à cette époque 57 échantillons de nourriture destinée au bétail provenant de neuf états différents. 36 échantillons correspondent à des rations mises en cause dans la maladie des animaux. Parmi ces échantillons, 32 ont une teneur en FB₁ supérieure à 10 µg/g (70), les concentrations de FB₂ détectées représentant 20 à 40 % des teneurs en FB₁. 19 échantillons de rations n'étant associées à aucune pathologie ont été également recueillis: FB₁ a été trouvée à des teneurs de 1 à 9 µg/g (seulement 2 échantillons à un taux supérieur à 5 µg/g).

Des cas de leucoencéphalomalacie équine sont rapportés dans le monde entier : Afrique du Sud, Chine, Nouvelle Calédonie, Egypte où le premier cas date de 1968 (2).

En France, la première description de cette toxicose remonte à 1983, date à laquelle les toxines responsables n'ont pas encore été identifiées (3). Depuis, plusieurs cas ont été rapportés périodiquement; plusieurs intoxications ont été confirmées dans le sud-ouest de la France, principale région productrice de maïs dont 5 cas au cours de l'hiver 1994-1995 (décès de 15 chevaux) et 3 cas au cours de l'hiver 1995-1996 (décès de 5 chevaux). Il ne semble pas exister de prédisposition d'espèces (chevaux, poneys, double-poneys), de race ou de sexe. De même, l'âge des chevaux atteints est très variable, de 1 à 15 ans. La plupart du temps, le diagnostic repose sur l'observation d'un tableau clinique évocateur associé à des conditions épidémiologiques particulières comme la consommation de maïs ou de dérivés. Cependant, le diagnostic de certitude nécessite l'examen anatomo-pathologique de l'encéphale et la mise en évidence de FB₁ dans les aliments.

Parallèlement à ces cas de leucoencéphalomalacie équine, durant la saison 1989-1990, on détecta aux Etats-Unis plusieurs épidémies d'œdème du poumon chez le porc (69). Très rapidement, les animaux ayant consommé des aliments contaminés ont développé un hydrothorax* et un œdème pulmonaire. La morbidité variait de 5 à 50% avec une mortalité de 50% dans les 4 à 10 jours suivant l'ingestion de la ration contaminée (67). On rapporta également quelques cas d'avortement chez des truies gestantes.

Un précédent rapport de chercheurs d'Afrique du Sud datant de 1981 montrait que des cultures de *F. moniliforme* pouvaient provoquer chez le porc un syndrome présentant comme signes prédominants un œdème pulmonaire et une nécrose* hépatique (70). Après les épidémies de 1989-1990, on apporta la preuve que les fumonisines étaient à l'origine de la maladie en reproduisant le syndrome avec des injections de FB₁ purifiée.

5.1.2- Etudes expérimentales chez l'animal

Les études expérimentales ont été menées chez différentes espèces animales afin d'examiner les effets aigus et chroniques des fumonisines. D'une part, on retrouve des symptômes qui sont spécifiques de l'espèce comme les lésions cérébrales chez le cheval, les lésions pulmonaires chez le porc, l'athérosclérose chez le singe. D'autre part, on retrouve chez toutes les espèces une toxicité hépatique, et dans une moindre mesure, une toxicité rénale (11).

5.1.2.1- Intoxication aiguë

5.1.2.1.1- Etude chez le cheval

Lors d'études expérimentales chez le cheval, l'administration de fortes doses de fumonisines conduit essentiellement à des lésions hépatiques. Les lésions cérébrales n'apparaissent qu'après une consommation répétée et prolongée de maïs contaminé (50). L'animal présente tout d'abord une phase d'inappétence* et de dépression, puis il y a apparition d'un oedème facial et d'un ictère marqué, témoin de lésions hépatiques importantes (3). On peut observer une paralysie de la langue et des lèvres. A l'autopsie, le foie est hypotrophié, ferme et jaunâtre. A l'examen microscopique, on observe une nécrose et une fibrose* periacineuse* accompagnées d'infiltration neutrophilique (3).

L'exposition des chevaux aux fumonisines conduit également à des lésions rénales avec des symptômes variés : néphropathie, néphrose, nécroses cellulaires (11).

5.1.2.1.2- Etude chez le singe

Des aliments, mélangés à une culture fongique de *F. moniliforme*, donnés à des singes induit une réponse athérogène (50), la ration contenant des niveaux de fumonisines compris entre 84 et 1.851 ppb. Un taux de 121 ppb provoque une hypercholestérolémie et une augmentation de l'activité transaminase sérique. Les auteurs de l'étude suggèrent que l'athérosclérose est secondaire à des lésions hépatiques dues à FB₁.

Ces résultats pourraient expliquer l'incidence beaucoup plus élevée d'athérosclérose chez les populations du nord de la Chine dont la ration alimentaire est basée sur le maïs, par rapport aux populations de la Chine du sud qui consomment essentiellement du riz (50).

5.1.2.1.3- Etude chez le porc

Dans une étude expérimentale, 6 porcs (groupe 1) ont été nourris avec des brisures de maïs contenant 92 µg/g de FB₁ et 2 porcs (groupe 2) avec une culture fongique de *F. moniliforme* mélangée à du maïs stérilisé, le mélange contenant 17 µg/g de FB₁ (53). 5 jours après l'ingestion, 4 des 6 porcs du premier groupe et un du deuxième groupe ont développé un oedème pulmonaire et sont décédés; les premiers signes cliniques étaient un refus de nourriture, un érythème cutané et une augmentation du rythme respiratoire. Les animaux sont ensuite devenus léthargiques* en position assise ou en décubitus latéral, avec une cyanose de la peau et des muqueuses, la mort survenant en quelques heures.

Les animaux survivants ont développé une hépatotoxicité aiguë avec un ictère marqué, des nécroses cellulaires et une augmentation de la bilirubine sérique et des enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase et gamma glutamyltranspeptidase).

Haschek et coll. (1992) ont proposé une explication à l'induction de l'oedème pulmonaire chez le porc (50), suggérant que le principal organe cible des fumonisines est le foie comme chez d'autres espèces, bien que les lésions hépatiques semblent moins importantes que les lésions pulmonaires. Les effets perturbateurs de FB₁ sur la biosynthèse des sphingolipides conduisent à des dommages de la membrane hépatocytaire dont des fragments sont libérés dans la circulation sanguine. Les poumons des porcs sont particulièrement riches en macrophages intravasculaires pulmonaires qui vont phagocyter ces fragments. Les macrophages vont alors relarguer des enzymes et autres médiateurs qui augmentent la perméabilité capillaire du tissu pulmonaire conduisant à un oedème. Cette hypothèse est supportée par l'observation au microscope électronique des macrophages intravasculaires pulmonaires de porcs ayant reçu des fumonisines, montrant de grandes quantités de corps multilamellaires correspondant aux fragments de membrane phagocytés.

Chez les autres espèces animales, les macrophages intravasculaires pulmonaires sont présents en beaucoup plus faibles quantités. Par exemple, il n'y en a pas chez le rat (50) ce qui explique que les fumonisines ne provoquent pas de tels dommages pulmonaires chez ces animaux.

5.1.2.1.4- Etude sur les animaux de laboratoire

Des études à court et à long terme sur des rats et des lapins ont montré que le foie et les reins sont les organes principalement touchés par la toxicité des fumonisines (66).

Dans une étude où des lapins ont reçu 4 à 5 fois par jour des injections intraveineuses de FB₁ à des taux variables (de 0,15 à 1mg/kg), ceux-ci deviennent léthargiques et anorexiques, avec baisse de l'excrétion urinaire (66). On constate de sévères lésions rénales avec une nécrose importante de l'épithélium du tubule proximal dans la partie extérieure de la medulla et dans le cortex. Des portions de tubule sont dilatées et contiennent des cellules épithéliales, des protéines et des amas granuleux dans la lumière. La créatinine, l'urée sériques et les protéines urinaires sont élevées.

Les lésions hépatiques sont dose-dépendantes et comprennent des nécroses cellulaires ainsi qu'une augmentation de la bilirubine et des enzymes hépatiques. Les autres organes ne sont pas affectés.

Des rats recevant des injections intraveineuses de 7,5 ou 10 mg de FB₁/kg/jour pendant 4 jours présentent les mêmes lésions rénales et hépatiques (9). On constate également une diminution du poids corporel, de la consommation de nourriture et de la production de fèces.

Les rats présentent une polyurie sans compensation par augmentation de la consommation d'eau. Les toxines ont également une action sur le système immunitaire se traduisant par une réduction du poids du thymus, avec nécroses disséminées et des taux d'immunoglobulines M sériques élevés.

Chez les volailles, ce sont les effets des fumonisines sur le système immunitaire qui prédominent (50). Il est connu que de nombreuses mycotoxines entraînent des déficiences immunitaires chez les volailles, ce qui pose de sérieux problèmes dans les élevages.

5.1.2.2- Intoxication chronique

5.1.2.2.1- Leucoencéphalomalacie équine

La leucoencéphalomalacie équine peut être suspectée dans tous les cas de troubles nerveux d'apparition brutale (en quelques heures). Cependant, la reproduction expérimentale de l'intoxication a permis de montrer que ces troubles n'apparaissent qu'après une consommation

répétée et prolongée de maïs contaminé (3). Cette période de latence varie entre deux semaines et un mois. Dans la majorité des cas, ces troubles sont caractérisés par une hyperexcitabilité, une hyperesthésie* et une démarche ébrieuse suivies en phase terminale par une période de dépression intense et un état comateux. L'animal présente une bradypnée* et une réduction du champ visuel allant jusqu'à l'amaurose*. Il n'a jamais été décrit de symptômes digestifs ou de signes de colique. L'évolution est toujours mortelle en 10 à 24 heures après le début des signes cliniques, et ce sans amélioration, quel que soit le traitement mis en œuvre.

L'autopsie ne révèle jamais de lésions macroscopiques d'intérêt diagnostique sur le squelette ou les viscères. Les lésions de leucoencéphalomalacie sont toujours limitées à l'encéphale, et dans une moindre mesure au foie. L'examen macroscopique de l'encéphale révèle des zones de liquéfaction de la substance blanche, localisées sur un ou les deux hémisphères cérébraux. L'étude microscopique permet de confirmer la présence de lésions de dégénérescence de la substance blanche associées à la présence d'hémorragies périvasculaires, de malacie* et d'infiltrats éosinophiliques.

Ces lésions varient d'une dégénérescence neuronale modérée à une liquéfaction d'une grande partie de la région corticale. Il semble qu'il n'y ait pas de corrélation directe entre l'étendue des lésions cérébrales et l'intensité du tableau clinique (103). Dans les stades initiaux de l'intoxication, seul un oedème périvasculaire est observé.

Le foie présente en général un aspect macroscopique normal. Des lésions microscopiques telles que la tuméfaction* des hépatocytes, une nécrose acineuse ou périacineuse et une surcharge lipidique sont parfois rapportées (3).

Figure 7: Portion rostrale de l'hémisphère cérébral droit, coupe transversale: atteinte préférentielle de la substance blanche (Sb), avec respect des circonvolutions de substance grise (Sg). Liquéfaction de la substance blanche cérébrale et formation de cavitations (→) contenant une substance granuleuse nécrotique (N) (3)

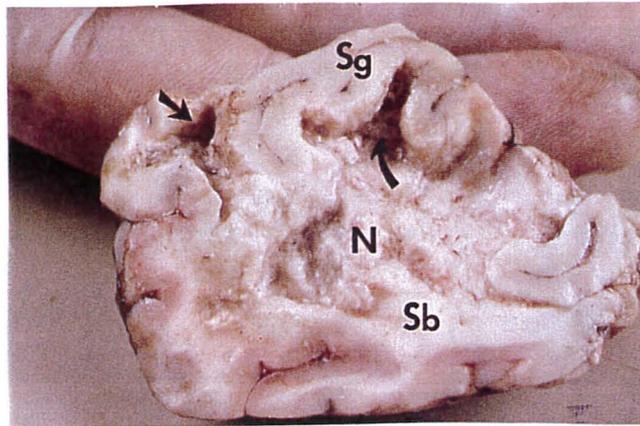
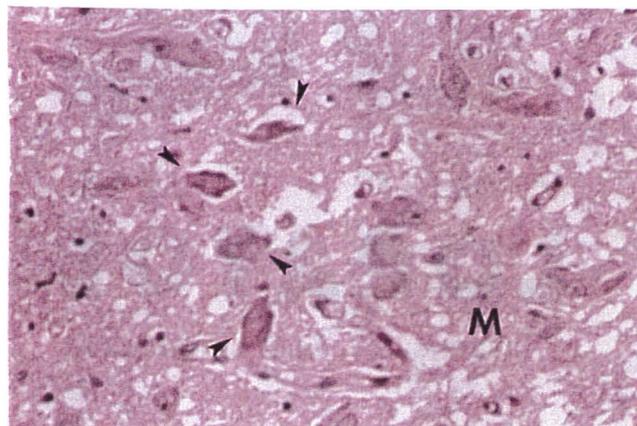


Figure 8: Encéphale, $\times 400$. Foyer de malacie (M) de la substance nerveuse avec neurones (➤) présentant des altérations morphologiques dégénératives (chromatolyse* centrale, rétraction cellulaire, condensation cytoplasmique) conséquentes de l'ischémie cérébrale (3)



5.1.2.2.2- Carcinogénicité

En 1989, Voss et coll. montrent l'effet carcinogène de *F. moniliforme* chez des rats nourris avec une culture fongique de *F. moniliforme* mélangée à des aliments (50). Ils mettent en place une étude où des rats sont nourris pendant quatre semaines avec des taux variés de *F. moniliforme*. La toxicité du champignon se traduit par une élévation des enzymes sériques et des lésions hépatiques histologiques.

A la même époque, Gelderblom et coll. mettent en œuvre une étude dans laquelle ils démontrent qu'une substance issue de *F. moniliforme* est un puissant agent promoteur de tumeur.

L'exposition chronique de rats à 50 mg de FB₁/kg de poids corporel entraîne l'apparition d'une hépatite chronique au bout de 6 mois, évoluant en cirrhose en 18 mois (23). 10/15 rats examinés entre le 18^{ème} et le 24^{ème} mois développent des carcinomes hépatocellulaires avec des métastases au cœur, poumons et reins pour 4 d'entre eux.

5.1.2.2.3- Embryotoxicité

Chez les souris et les rates, les fumonisines ne semblent pas traverser le placenta; ces toxines ne sont ni tératogènes ni embryotoxiques en l'absence de toxicité maternelle (10). Cependant, chez des rates gestantes nourries entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour de gestation avec une ration contenant 60 mg de FB₁ purifiée /kg, on constate une diminution du poids de la portée et une ossification plus faible (36).

L'injection de FB₁ dans des œufs stérilisés entraîne des malformations des embryons de poulet allant jusqu'à la mort (10, 26). Mais les doses nécessaires sont importantes et aucune étude n'a montré le passage de FB₁ dans les œufs après ingestion d'aliments contaminés.

Chez des lapines gestantes recevant entre 0,25 et 1,75 mg de FB₁/kg de poids corporel/jour entre le 3^{ème} et le 19^{ème} jour de gestation, on constate des lésions cellulaires dans le foie et les reins mais pas d'effet tératogène (10).

D'après ces études, les fumonisines ne semblent donc pas tératogènes. De plus, aucune étude n'a montré leur transmission materno-foetale.

5.1.2.2.4- Mutagénéicité et génotoxicité

Du maïs naturellement contaminé, impliqué dans une épidémie de leucoencéphalomalacie équine dans le sud ouest de l'Arizona a été analysé pour son potentiel mutagène, en utilisant un test de mutation génique, le test d'Ames (55). Les auteurs ont également testé un extrait de FB₁ pure ainsi qu'un extrait de maïs contaminé ayant subi un procédé d'ammoniation.

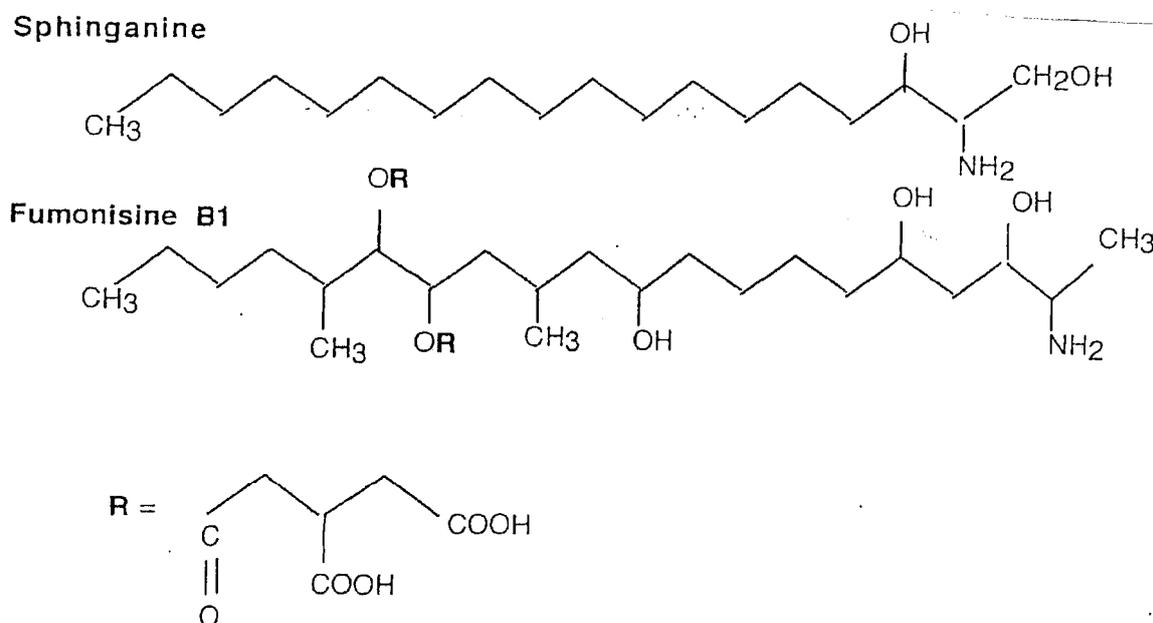
Aucune activité mutagène n'a été observée, tant sur le maïs contaminé, qu'avec FB₁ pure. D'autres études ont confirmé ce résultat (16, 32).

FB₁ étant non génotoxique, elle entraîne cependant à faible concentration (inférieure à 1 µg/ml) une augmentation modérée des fréquences micronucléaires mais sans effet dose-dépendant clairement établi. A des niveaux d'exposition plus importants, ces fréquences diminuent.

5.1.3- Mode d'action des fumonisines

Les fumonisines ont une structure semblable à celle de la sphinganine, un intermédiaire dans la synthèse des sphingolipides.

Figure 9: Formules chimiques de FB₁ et de la sphinganine

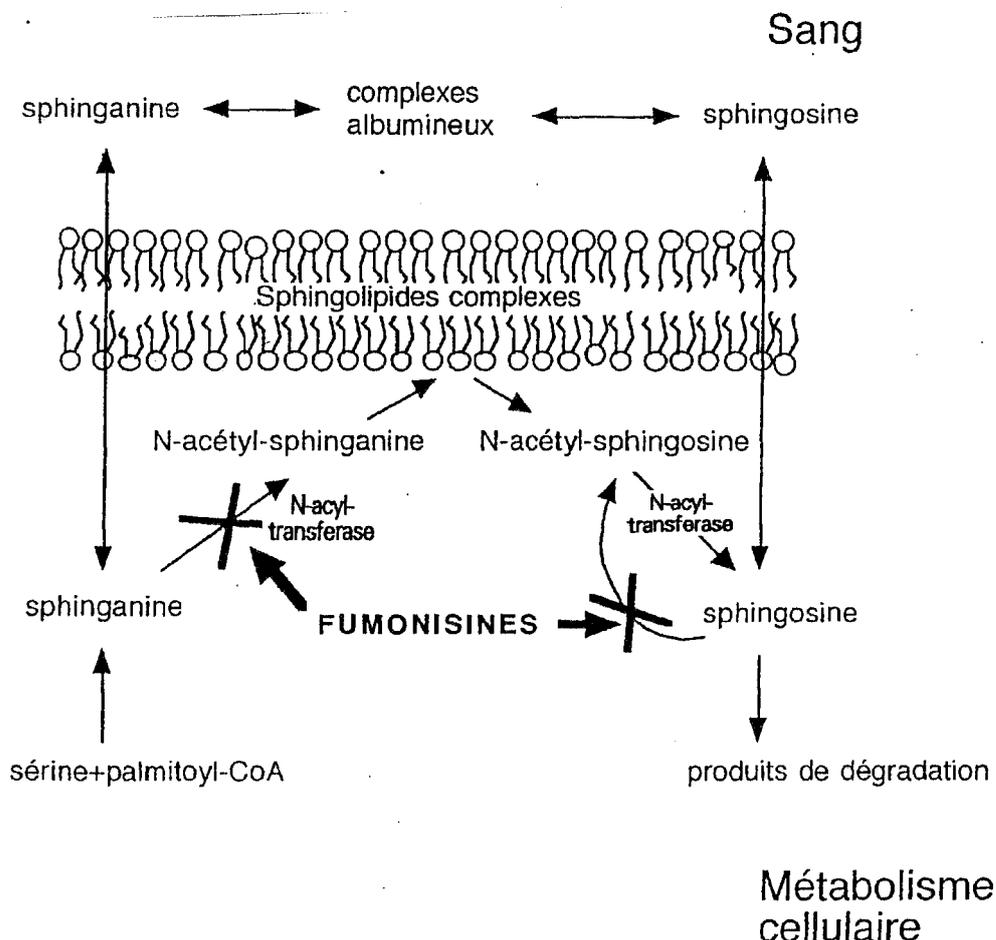


Cette ressemblance structurale laisse supposer que les fumonisines interagissent avec les enzymes du métabolisme des sphingolipides ou interfèrent avec les fonctions des sphingolipides, ou agissent sur les deux tableaux (66).

Lors d'expériences de laboratoire chez des rats exposés aux fumonisines, des altérations des bases sphingoides libres sont détectées avant ou en même temps que les lésions structurales. Chez des porcs exposés aux fumonisines, on trouve une relation dose-dépendante entre l'augmentation intracellulaire de bases sphingoides et/ou une diminution des sphingolipides complexes, les perturbations chimiques et histologiques indiquant une atteinte cellulaire. Lors d'études *in vitro* sur des cultures de diverses cellules (neuronales, rénales, fibroblastes, kératinocytes et carcinome du colon), on a montré que, soit une réduction de la sphinganine libre (obtenue avec des inhibiteurs de la sérine palmitoyltransférase), soit une supplémentation du milieu de culture (addition de céramides ou de sphingolipides complexes), inverse complètement ou partiellement les effets de FB₁ sur la croissance cellulaire, la différenciation et/ou la mort cellulaire (66).

FB₁ est un puissant inhibiteur d'une enzyme intervenant dans la biosynthèse des sphingolipides: la céramide synthétase ou N acyltransférase. Cette enzyme catalyse la réaction d'acylation de la sphinganine dans la synthèse *de novo*, mais également la réacylation de la sphingosine issue du "turn-over" des sphingolipides (50).

Figure 10: Métabolisme des sphingolipides et niveau d'action des fumonisines



L'incorporation de sérine marquée au ^{14}C a permis de connaître à quel niveau agit FB_1 dans la synthèse *de novo* des sphingolipides (50); elle ne bloque pas la synthèse de la 3-ketosphinganine ou de la sphinganine; par contre, on observe une accumulation de sphinganine marquée au ^{14}C .

5.1.3.1- Inhibition de la céramide synthétase *in vitro*

Les fumonisines peuvent inhiber la céramide synthétase à faibles concentrations micromolaires. Sur des cellules épithéliales rénales, on constate une mort cellulaire après une exposition de 4 jours à des concentrations de FB_1 supérieures à 35 μM . Des concentrations de toxines comprises entre 10 et 35 μM inhibent la prolifération cellulaire. A de telles concentrations, la biosynthèse des sphingolipides est altérée après une exposition de 2 à 4 heures (50). Les cellules les plus sensibles sont les hépatocytes de rats. L'inhibition est obtenue avec une CI_{50} de 0,1 μM pour FB_1 et FB_2 . Les niveaux de sphinganine libre sont multipliés par 110 quand ces cellules sont incubées avec 1 μM de FB_1 pendant 4 jours (43).

FB_1 inhibe la céramide synthétase avec la sphinganine (substrat), et avec l'acyl coenzyme A (co-substrat) dérivant d'une variété d'acides gras. L'inhibition est compétitive, FB_1 pouvant se fixer sur le site de liaison de la sphinganine (sphingosine) ou sur le site de liaison de l'acyl CoA. En effet, l'enzyme reconnaît à la fois le groupe amino (correspondant à la base sphingoïde) et les acides tricarballoyliques des chaînes latérales de FB_1 (correspondant à l'acyl CoA) (66).

Des études ont montré que la fumonisine A_1 , qui a la même structure que FB_1 excepté un groupe acétyl CH_2CO sur l'atome d'azote, a une action 50 fois plus faible. Elle inhibe moins de 2% de l'activité de la céramide synthétase à 10 μM (43). De même, si on enlève par hydrolyse les acides tricarballoyliques de la structure de FB_1 , on réduit l'action de la toxine d'un facteur 10 (43).

On s'est demandé si les fumonisines pouvaient inhiber d'autres enzymes utilisant des bases sphingoïdes ou de l'acyl CoA dérivé d'acides gras. On a testé l'action de FB_1 sur la sphingosine kinase et la sérine palmitoyltransférase. Aucune de ces enzymes n'est inhibée à des doses qui conduisent à une inhibition totale de la céramide synthétase (430).

5.1.3.2- Inhibition de la céramide synthétase *in vivo*

La perturbation du métabolisme des sphingolipides entraîne:

- une inhibition de la biosynthèse des céramides
- une déplétion en sphingolipides complexes
- une augmentation de la sphinganine libre
- une accumulation de sphingosine issue du "turn-over" des sphingolipides
- une augmentation des produits de dégradation des bases sphingoides

[sphinganine (sphingosine) 1-phosphate, éthanolamine phosphate, aldéhydes d'acides gras]

- une altération des autres pools lipidiques due à l'augmentation de ces produits de dégradation.

L'action de FB₁ sur la céramide synthétase résulte en une augmentation rapide de la sphinganine intracellulaire, ainsi que du rapport sphinganine / sphingosine. Chez les animaux exposés aux fumonisines, ce phénomène intervient avant l'apparition des premiers signes cliniques. La présence de sphinganine dans le sang, les urines et les tissus est un biomarqueur qui permet de diagnostiquer la contamination. Chez les équidés, on ne trouve en général que quelques traces de bases sphingoides dans les tissus (66). Néanmoins, chez des poneys nourris avec une ration contenant 22 ppm de FB₁, l'augmentation dans le sérum des bases sphingoides se produit au moins 42 jours avant toute modification chimique montrant une atteinte cellulaire, et approximativement 60 jours avant la mort des animaux. Dans une autre étude, l'augmentation des bases sphingoides dans le sérum, le foie et les reins de chevaux exposés, ainsi que la diminution des concentrations de sphingolipides complexes dans le foie et les reins sont détectées chez ces animaux alors qu'ils ne présentent aucun autre signe (66).

Des résultats similaires ont été trouvés chez les porcs (66), de plus, les auteurs ont montré une relation dose-dépendante entre le ratio sphinganine / sphingosine dans le sérum et les tissus de porcs contaminés et la quantité de fumonisines ingérée.

Chez des poulets nourris avec une ration supplémentée avec une culture fongique de *F. moniliforme* ou avec FB₁ pure, l'augmentation de sphinganine dans les tissus est trouvée pour des doses de FB₁ considérées comme non toxiques (66). Ces résultats sont également cohérents avec ceux obtenus avec les animaux de laboratoire.

Le taux de sphinganine dans le sérum peut être utilisé pour détecter une consommation de fumonisines avant que ces toxines ne provoquent des lésions irréversibles chez l'animal. Si à

ce stade on stoppe la consommation des aliments contaminés, le taux de sphinganine redevient normal (43).

Sous l'action des fumonisines, la concentration de sphingosine libre augmente également, du fait de l'inhibition de la N acyltransférase. Cependant, 95 % de l'augmentation des bases sphingoides est due à la sphinganine (66). La sphingosine traverse rapidement la membrane cellulaire; en revanche, la demie-vie de la sphinganine dans la cellule est beaucoup plus longue que celle de FB₁. Cela suggère que, soit l'inhibition de la céramide synthétase est persistante, soit la sphinganine ne diffuse pas facilement hors de la cellule. Cette atteinte du métabolisme sphingolipidique entraîne également une perturbation du métabolisme des phosphoglycérolipides et des acides gras. Chez des hépatocytes exposés aux fumonisines, une partie de la sphinganine qui s'est accumulée est métabolisée en sphinganine-1-phosphate qui est ensuite clivée en hexadecanal (aldéhyde d'acide gras) et en éthanolamine phosphate qui sont incorporés dans d'autres biosynthèses, notamment dans la formation de phosphatidyléthanolamine (43). On a estimé que pour la synthèse de ce composé, 1/3 de l'éthanolamine provient du catabolisme des bases sphingoides (66). Cette capacité qu'ont les cellules de rapidement métaboliser des bases sphingoides actives en composés moins actifs les protège de la toxicité associée à ces bases et à leurs métabolites.

On a identifié un gène qui transfère à des levures une résistance aux effets de la sphingosine; ce gène code pour la synthèse d'une enzyme: la sphingosine-phosphate ligase (66).

L'inhibition de la céramide synthétase conduit à une réduction de la formation de sphingolipides complexes. La biosynthèse de la sphingomyéline est inhibée plus rapidement, et à des concentrations de fumonisines plus faibles que la biosynthèse des glycosphingolipides (66). Ce phénomène est observé dans un deuxième temps par rapport à l'augmentation des bases sphingoides car le "turn-over" des sphingolipides est lent.

5.1.3.3- Toxicité des fumonisines due à l'altération de la synthèse des sphingolipides

La perturbation de la biosynthèse des sphingolipides entraîne de profonds effets dans les cellules car ces composés jouent un rôle important dans:

- la structure des membranes et des lipoprotéines
- la communication intercellulaire
- les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire
- la régulation des récepteurs des facteurs de croissance

Ils jouent le rôle de seconds messagers pour un grand nombre de facteurs comme le TNF, l'interleukine 1 et le facteur de croissance des nerfs (43).

Cette perturbation de la biosynthèse des sphingolipides conduit à de nombreuses réactions qui pourraient expliquer la cytotoxicité (Tableau 16) et la carcinogénicité (Tableau 17) des fumonisines.

L'accumulation de sphinganine et de ses métabolites est inhibiteur de croissance cellulaire et cytotoxique, pouvant conduire à la mort cellulaire. Elle inhibe la protéine kinase C, active la phospholipase D, inhibe la pompe ATPase Na^+/K^+ dépendante, induit la déphosphorylation de la protéine rétinoblastome (une des protéines clef du cycle cellulaire, régulatrice de la transition entre la phase G et la phase S), induit la libération de calcium intracellulaire (*via* la sphingosine-1-phosphate) et affecte un grand nombre de systèmes de régulation cellulaire. De plus, la sphingosine est capable d'induire une apoptose* au sein de thymocytes et de neutrophiles (43).

Tableau 16: Mécanismes possibles pour l'inhibition de croissance cellulaire et la cytotoxicité dues aux fumonisines

- Accumulation de sphinganine, de sphingosine et de leurs métabolites
- Déplétion en sphingolipides complexes
- Inhibition de la pompe ATPase Na⁺/K⁺ dépendante
- Inhibition de la protéine kinase C
- Libération de calcium intracellulaire
- Promotion de la déphosphorylation de la protéine rétinoblastome
- Induction d'apoptose

Tableau 17: Mécanismes possibles pour la carcinogénicité des fumonisines

- Activation de la phospholipase D et/ou inhibition de l'acide phosphatidique phosphohydrolase
- Libération de calcium intracellulaire
- Perte de régulation de différenciation cellulaire
- Perte de régulation de l'apoptose
- Perte des médiateurs lipidiques de TNF

La perte de la biosynthèse des sphingolipides complexes peut également conduire à la mort cellulaire. Sur des cultures neuronales, la déplétion en sphingolipides conduit à l'inhibition de la croissance axonale et de la formation de synapse (66, 43). Cette inhibition est réversible si on supplémente les cellules en céramides.

Si les fumonisines induisent la mort cellulaire chez certaines cellules, elles vont au contraire stimuler la prolifération d'autres types de cellules. Chez l'homme, FB₁ a un effet antimittotique sur les kératinocytes, les cellules d'hépatocarcinome et les cellules oesophagiennes (96). En revanche, FB₁ stimule la prolifération des cellules rénales, hépatiques et oesophagiennes chez des rats traités par voie intraveineuse pendant 12 heures à 5 jours avec 1,25 mg de FB₁/kg de poids corporel (39). Spiegel et coll. (43) ont montré que la sphingosine-1-phosphate pouvait induire la synthèse d'ADN chez des cellules Swiss 3T3. Ainsi, pour un tissu donné, l'exposition aux fumonisines peut entraîner à la fois la mort de certaines cellules, l'arrêt ou

l'accélération de la croissance d'autres cellules. Si ces cellules rentrent dans une phase de cycle inappropriée, cela entraîne une augmentation de l'instabilité génomique et un risque cancérigène.

5.1.3.4- Autres mécanismes

Les fumonisines affectent d'autres aspects du métabolisme lipidique et différentes voies de la régulation cellulaire indépendamment de la perturbation du métabolisme des sphingolipides.

Chez des rats nourris pendant deux ans avec des rations contenant des fumonisines, on constate des modifications des taux de cholestérol, de phospholipides et d'acides gras libres sans augmentation significative des taux de bases sphingoides (66). FB₁ affecte la synthèse des lipides cellulaires en empêchant l'incorporation de l'acide palmitique (24).

FB₁ stimule la cascade de l'acide arachidonique (59) en stimulant la protéine kinase activée par le mitogène. Ce composé induit la modulation de la transcription et l'activation d'un certain nombre d'enzymes dont la phospholipase A₂.

FB₁ entraîne une inhibition de l'adhésion cellulaire en agissant directement sur les récepteurs à la surface des cellules (57). Cet effet est dose-dépendant; une dose de 100 µM de FB₁ conduit à une diminution de 80 % de l'adhésion cellulaire. Il est à souligner que ces récepteurs de surface interviennent également dans la communication intercellulaire.

En 1998, Mobio et coll. ont montré que FB₁, à faible concentration (0,14 mM), induit de façon précoce dans la cellule une lipopéroxydation entraînant des lésions de l'ADN caractérisées par une fragmentation de l'ADN due en partie, à un phénomène d'apoptose (1). De plus, la lipopéroxydation conduit à la formation de bases oxydées; une telle lésion peut être réparée par l'intervention du gène p53, ce qui nécessite un arrêt du cycle cellulaire; mais si la lésion persiste, elle est à l'origine d'un phénomène d'apoptose (44). Simultanément, une synthèse résiduelle d'ADN se poursuit, pouvant expliquer la propriété promotrice de tumeur de FB₁. Les fumonisines induisent également une hyperméthylation de l'ADN conduisant à la répression des gènes suppresseurs de tumeur et favorisant la prolifération des cellules tumorales. A l'inverse, cette hyperméthylation peut stimuler l'expression d'oncogènes et ainsi permettre l'évolution vers le développement d'une tumeur.

L'implication de la peroxydation lipidique dans le mécanisme d'action de FB₁ a été confirmée en utilisant de la vitamine E (antioxydante et antiradicalaire) qui empêche en grande partie ces effets (45).

5.2- Effets des fumonisines chez l'homme

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, dans diverses régions du Monde (Chine, Afrique du Sud, Italie) on constate une relation entre une incidence élevée de cancer oesophagien et la présence de fumonisines dans l'alimentation des populations concernées.

L'agence internationale pour la recherche contre le cancer (IARC) a classé les toxines de *F. moniliforme* et notamment les fumonisines comme "cancérogènes humains potentiels" (classe 2B) (60).

On ne sait pas si l'exposition de l'homme aux fumonisines entraîne une augmentation de la concentration de sphinganine dans les tissus, le sérum et les urines (66). Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre avec certitude le mode d'action toxique de ces fumonisines chez l'homme.

Quelques recommandations ont été émises et sont contenues dans le rapport de la Troisième Conférence Mixte FAO/OMS sur les mycotoxines qui se déroula du 3 au 6 mars 1999 à Tunis.

- L'établissement de limites de sécurité concernant l'exposition alimentaire humaine aux fumonisines doit prendre en compte les populations qui consomment un pourcentage élevé de leurs calories sous forme de farine de maïs.

- La recherche sur le pouvoir cancérogène de FB₁ doit continuer à être prioritaire.

- Des dispositions doivent être prises afin de mieux connaître les effets non cancérogènes des fumonisines.

- Outre les études à long terme sur l'alimentation animale récemment menées, il faut poursuivre les recherches dans les domaines suivants avant de pouvoir évaluer correctement les risques causés par les fumonisines sur la santé humaine et animale :

- . enquêtes précises et détaillées sur les aliments à base de maïs destinés à la consommation humaine et animale à l'aide de méthodes analytiques validées.

- . estimation précise de la consommation de maïs chez les populations résidant dans des zones géographiques à haut risque de cancer oesophagien ainsi que dans celles où le risque est faible. Il faut vérifier le lien entre la consommation de fumonisines et le développement de cancer oesophagien (et éventuellement d'autres cancers et maladies chroniques telles les maladies rénales, hépatiques et cardiovasculaires).

- Il faut poursuivre les recherches afin de mettre au point un biomarqueur efficace de l'exposition aux fumonisines.

- Il faut mener des études visant à élucider la cause de la diversité des effets toxiques observés chez les animaux.
- Il faut savoir ce que deviennent les fumonisines dans l'environnement.

En conclusion, l'observation d'intoxications naturelles ainsi que les expériences de laboratoire ont permis de prouver la toxicité des fumonisines et de comprendre leur mécanisme d'action. L'altération du métabolisme des sphingolipides par ces toxines est à l'origine des troubles cellulaires constatés même si on sait que les fumonisines peuvent également agir à d'autres niveaux. Chez l'homme, le rôle exact des fumonisines n'est pas clairement établi. *F. moniliforme* produit d'autres composés comme la fusarine C qui est un puissant agent mutagène (50). De plus, on a vu que le maïs pouvait être colonisé par plusieurs espèces susceptibles d'élaborer des mycotoxines dangereuses comme les aflatoxines.

Dans le maïs naturellement contaminé, on retrouve les trois fumonisines FB₁, FB₂ et FB₃. Si FB₁ est sans conteste l'agent le plus toxique, qu'en est-il de FB₂ et FB₃? Dans une étude où 3 poneys sont nourris avec une ration contenant 3 ppm de FB₁, 75 ppm de FB₂ et moins de 1 ppm de FB₃, les auteurs ont euthanasié au 136^{ème} jour de l'étude, 2 poneys qui présentaient des convulsions suivies d'une ataxie, une dépression et un décubitus latéral (69). A l'autopsie, l'encéphale a montré les signes caractéristiques de leucoencéphalomalacie avec des zones de liquéfaction de la substance blanche. En parallèle à cette étude, 3 poneys ont été nourris avec une ration contenant moins de 1 ppm de FB₁, moins de 1 ppm de FB₂ et 75 ppm de FB₃. Ces animaux ont consommé leur ration pendant 56 jours. Ils n'ont présenté aucun signe clinique et les valeurs sériques sont restées normales. Après euthanasie, on n'a retrouvé aucune lésion microscopique à l'autopsie.

Il semble donc que FB₂ soit aussi toxique que FB₁ et pourrait être à l'origine de leucoencéphalomalacie équine. En revanche, FB₃ ne semble pas aussi toxique que FB₁ et FB₂.

CONCLUSION

Fin des années 1980, une nouvelle classe de toxines fongiques, les fumonisines, a été découverte et suspectée dans une affection nerveuse chez le cheval. Les effets toxiques des fumonisines chez l'animal sont désormais établis. Chez l'homme, le rôle étiologique de ces toxines dans certaines pathologies reste suspecté mais non prouvé. Etant donné la présence des fumonisines dans le Monde entier, peut-on évaluer les risques que présentent ces métabolites fongiques pour la santé humaine? Quels sont les moyens pour les limiter au maximum?

La principale source d'exposition de l'homme aux fumonisines est la consommation directe de denrées contaminées par des souches de *Fusarium*, essentiellement *F. moniliforme*. Du fait du métabolisme des fumonisines, le risque de transmission suite à la consommation de tissus animaux, de lait ou d'œufs est faible. La surveillance au niveau mondial des productions céréalières et surtout du maïs est nécessaire par la mise en œuvre de techniques d'analyse rapides et efficaces. Les fumonisines sont des composés stables, difficiles à éliminer. Il est donc préférable de prévenir et limiter le développement des moisissures dans les grains stockés. Les micromycètes ne peuvent se développer (ni les mycotoxines être produites) dans des denrées convenablement séchées. Par conséquent, un séchage approprié et le maintien à l'état sec des denrées sont des moyens de prévention efficaces de la production de mycotoxines. Le séchage doit avoir lieu aussitôt après la récolte. Le taux d'humidité critique ne doit pas dépasser 70%; cela peut poser un problème dans les pays tropicaux en raison du niveau élevé de l'humidité ambiante. Un séchage efficace suivi d'un stockage immédiat dans des sacs en plastique permet de surmonter ces difficultés. A petite échelle, les sacs en polyéthylène sont suffisants, mais à grande échelle, un bon stockage exige des structures conçues avec un sol et des murs imperméables. Les grains abîmés sont plus sujets aux attaques des champignons et par conséquent à une contamination par les mycotoxines. Il est donc important qu'ils ne soient pas abîmés avant et pendant le séchage puis au cours du stockage. Les insectes sont une cause importante de détérioration; les ravageurs des champs et certaines espèces trouvées dans les stocks attaquent le sommet des grains, constituant une porte d'entrée pour les micromycètes. Il est donc essentiel que les grains stockés soient conservés indemnes d'insectes, sinon les problèmes d'humidité et de moisissures deviennent inévitables. Le risque augmente lorsque les grains souffrent d'un manque de ventilation et plus particulièrement si les contenants sont en métal.

Plusieurs gouvernements ont mis en place des limites réglementaires de teneurs en mycotoxines dans les denrées mises sur le marché. Ces limites pour les fumonisines sont en cours d'examen. La plupart des pays développés ne permettront pas l'importation de denrées aux teneurs en mycotoxines supérieures aux valeurs autorisées. Dans ces pays à niveau de vie élevé, la diversité des aliments constituant la ration journalière, ainsi que les divers contrôles effectués sur les productions céréalières limitent les risques d'intoxication. Mais le problème se pose dans les régions tropicales ou subtropicales (régions d'Afrique, Chine) où d'autres facteurs s'ajoutent aux conditions de température et d'humidité favorables à la production de mycotoxines. Les conditions socio-économiques précaires que l'on trouve dans ces régions entraînent une consommation journalière importante, et parfois exclusive de maïs ou de dérivés. De plus, des pratiques alimentaires particulières, comme la fabrication artisanale de bière à partir des grains moisissés, conduisent à une ingestion quotidienne non négligeable de fumonisines.

Ces toxines appartiennent à la classe 2B (cancérogènes potentiels) des cancérogènes chez l'homme. L'inhibition de la synthèse des sphingolipides semble jouer un rôle primordial, les implications de cette inhibition n'étant pas clairement établies tant le rôle des sphingolipides dans la vie de la cellule est complexe. Les fumonisines sont les seuls composés capables de bloquer spécifiquement la céramide synthétase. Deux métabolites fongiques produits par *Aspergillus fumigatus*, les sphingofungines B et C, inhibent la première réaction enzymatique de la biosynthèse des sphingolipides. Ainsi, il y a une relation étroite entre mycotoxines et sphingolipides. Pour expliquer le mode d'action toxique des fumonisines, il faut avant tout comprendre le rôle des sphingolipides dans la vie cellulaire et pour se faire, l'utilisation des fumonisines comme outil de recherche permet de faire avancer ces connaissances.

THESE SOUTENUE PAR : DUCRET Céline

TITRE : Une nouvelle classe de mycotoxines : les fumonisines

CONCLUSIONS

Les mycotoxines sont des composés naturels élaborés par de nombreuses espèces de moisissures pouvant se développer à tous les stades de la chaîne alimentaire, depuis le champ de culture jusqu'à la préparation des aliments destinés à l'homme. Leur implication dans diverses pathologies animales et les répercussions économiques qui en découlent sont bien connues ; cependant, leur incidence sur la santé humaine reste toujours d'actualité et fait l'objet de nombreuses recherches.

Fin des années 80, une nouvelle famille de toxines fongiques est caractérisée : les fumonisines, suspectées d'être à l'origine d'une maladie nerveuse touchant les chevaux. La fumonisine B₁ (FB₁) est la plus abondante de ce groupe et est produite essentiellement par *Fusarium moniliforme* et *proliferatum* ; elle contamine les céréales (surtout le maïs et dans une moindre mesure le blé) et leurs dérivés alimentaires qui représentent une grande part de l'alimentation humaine et animale. *F. moniliforme* se développe dans le monde entier, partout où le maïs est cultivé, à l'exception des régions froides comme le nord de l'Europe ou le Canada qui semblent échapper à ce problème. FB₁ est un dérivé polyacétoacide qui, une fois absorbé par voie orale, présente une faible biodisponibilité et est rapidement éliminé non métabolisé dans les fèces. Toutefois, FB₁ exerce sa toxicité à faible dose (10 µg/g) au niveau d'organes cibles : le foie et les reins. De ce fait, le développement de techniques analytiques rapides et fiables tels la chromatographie liquide haute performance ou les tests ELISA, pouvant détecter et doser de faibles quantités de fumonisines dans les denrées alimentaires, a permis d'élargir le contrôle des productions céréalières.

De nombreux travaux concernent la toxicité aiguë et chronique des fumonisines, notamment chez les équidés (leucoencéphalomalacie), les porcs (oedème pulmonaire aigu) et les rongeurs (hépatotoxique et néphrotoxique, carcinogénicité). FB₁ est un analogue structural de la sphinganine et de la sphingosine et est connue pour être un inhibiteur de la N-acyltransférase ou céramide synthétase. La différenciation et la prolifération cellulaires anarchiques découlant de cette perturbation de la biosynthèse des sphingolipides expliquent les propriétés

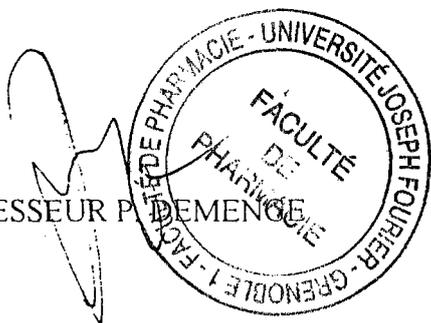
promotrices de tumeur des fumonisines. Chez l'homme, des données épidémiologiques montrent une relation entre le développement de cancer oesophagien et la présence dans l'alimentation de fumonisines dans des zones géographiques où le maïs constitue l'aliment de base de la ration journalière (Afrique du Sud, Chine, nord de l'Italie). Mais cette hypothèse demande à être confirmée par des données scientifiques. L'agence internationale pour la recherche contre le cancer (IARC) a classé les toxines de *F. moniliforme*, et notamment les fumonisines, comme "possibles cancérogènes humains" (classe 2B) et les limites réglementaires de teneurs en fumonisines dans les denrées mises sur le marché sont en cours d'examen.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 28 Novembre 2000

LE DOYEN

PROFESSEUR P. DEMENGE



LE PRESIDENT DE THESE

DOCTEUR S. KRIVOBOK

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ABADO-BECOGNEE K., MOBIO T.A., ENNAMANY R., FLEURAT-LESSARD F., SHIER W.T., BADRIA F. and CREPPY E.E. Cytotoxicity of fumonisin B₁: implication of lipid peroxydation and inhibition of protein and DNA syntheses.
Arch. Toxicol., 1998, **72**: 233 - 236.
- 2- BADIALI C., MANDOU H.A-Y., RADWAN A.I., HAMOY F.M. and HELDEBRANDT P.K. Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in egyptian equidae.
Amer. J. Vet. Res., 1968, **29**: 2029 - 2035.
- 3- BAILLY J.D., RAYMOND I., LE BARS P., GUYOMARD Y., ABADIE J., LE BARS J., GUERRE P., DELVERDIER M. and BURGAT V. Leucoencéphalomalacie des équidés. Cas rapportés au CNITV.
Rev. Méd. Vét., 1996, **147**: 787-796.
- 4- BAKAN B., CAHAGNIER B. and MELCION D. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in domestics wheat and corn harvested in 1996 and 1997 and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates from these samples.
Laboratoire de microbiologie et technologie céréalières, INRA, Nantes, France.
- 5- BENNETT G.A. and RICHARD J.L. Liquid chromatographic method for analyse of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisins.
J.A.O.A.C. , 1994, **77**: 177-183.
- 6- BEZUIDENHOUT S.C., GELDERBLOM W.C., GORST-ALLMAN C.P., HORAK R.M., MARASAS W.F., SPITELLER G. and VLEGGAAR R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*.
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1988, **11**: 743 - 745.
- 7- BHAT R.V., SHETTY P.H., AMRUTH R.P. and SUDERSHAN R.V. A foodborne disease outbreak due to the conseption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins.
Clinical Toxicol., 1997, **35**: 249 - 255.
- 8- BLACKWELL B.A., MILLER J.D. and SAVARD M.E. Production of carbon 14-labeled fumonisin in liquid culture.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 506-511.
- 9- BONDY G., SUZUKI C., BARKER M.; ARMSTRONG C., FRENIE S., HIERLIHY L., ROWSELL P. and MUELLER R. Toxicity of fumonisin B₁ administered intraperitoneally to male sprague-dawley rats.
Food Chem. Toxic., 1995, **8**: 653-665.
- 10- BUCCI T.J. and HOWARD P.C. Effect of fumonisin mycotoxins in animals.
J. Toxicol. - Toxin Rev., 1996, **15**: 293-302.
- 11- BUCCI T.J., HOWARD P.C., TOLLESON W.H., LABORDE J.B. and HANSEN D.K. Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals.
Toxicol. Pathology, 1998, **26**: 160-164.

- 12- BUCKLEY S.S. and Mc CULLUM W.G. Acute haemorrhagic encephalitis prevalent among horses in Maryland.
Amer. Vet. Rev., 1901, **25**: 99 - 101.
- 13- CHU F.S. and LI G.Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the people's Republic of China in regions with high incidence of oesophageal cancer.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, **60**: 847-852.
- 14- CHULZE S.N., RAMIREZ M.L., FARNOCHI M.C., PASCALE M., VISCONCI A. and MARCH G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in argentinian corn at different ear maturity stages.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 2797-2801.
- 15- DESJARDINS A.E., PLATTNER R.D. and NELSON P.E. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, **60**: 1695-1697.
- 16- DIRHEIMER G. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins.
Rev. Méd. Vét., 1998, **149**: 605-616.
- 17- DOKO M.B., CANET C., BROWN N., SYDENHAM E.W., MPUCHANE S. and SIAME B.A. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 3240-3243.
- 18- DOKO M.B., RAPIOR S., VISCONTI A. and SCHJOTH J.E. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes in Europe and Africa.
J. Agric. Food Chem., 1995, **43**: 429-434.
- 19- DOKO M.B. and VISCONTI A. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn-based human foodstuffs in Italy.
Food Addit. Contam., 1994, **11**: 433-439.
- 20- FAZEKAS B., KIS M. and HAJDU E.T. Data on the contamination of maize with fumonisin B₁ and other fusariotoxins in Hungary.
Acta Vet. Hung., 1996, **44**: 25-37.
- 21- GALTIER P. Biological fate of mycotoxins in animals.
Rev. Méd. Vét., 1998, **149**: 549-554.
- 22- GELDERBLOM W.C., JASKIEWICZ K., MARASAS W.F., THIEL P.G., HORACK R.M., VLEGGAAR R. and KRIEK N.P. Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54**: 1806 - 1811
- 23- GELDERBLOM W.C., KRIEK N.P., MARASAS W.F. and THIEL P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats.
Carcinogenesis, 1991, **12**: 1247-1251.

- 24- GELDERBLOM W.C., SMUTS C.M., ABEL S., SNYMAN S.D., CAWOOD M.E., VAN DER WESTHUIZEN L. and SWANEVELDER S. Effects of fumonisin B₁ on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes.
Food Chem. Toxicol., 1996, **34**: 361 - 369.
- 25- GELDERBLOM W.C., SNYMAN S.D., ABEL S., LEBEPE-MAZUR S., SMUTS C.M. VAN DER WESTHUIZEN L., MARASAS W.F. and VICTOR T.C.
In *Fumonisin in Food*. Ed. L. Jackson , Plenum Press, New York, 1996.
- 26- HLYWKA J.J., BECK M.M. and BULLERMAN L.B. The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays to assess the toxicity of fumonisin B₁ mycotoxin.
Food Chem. Toxicol., 1997, **35**: 991-999.
- 27- HOLCOMB M., THOMPSON Jr H.C., LIPE G. and HANKINS L.J. HPLC with electrochemical and fluorescence detection of the OPA/2-methyl-2-propanethiol derivative of fumonisin B₁.
J. Liquid Chromatogr., 1994, **17**: 4121-4129.
- 28- JACKSON L.S., HLYWKA J.J., SENTHIL K.R. and BULLERMAN L.B. Effect of thermal processing on the stability of fumonisins.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **392**: 345-353.
- 29- JACKSON L.S., HLYWKA J.J., SENTHIL K.R. and BULLERMAN L.B. Effect of thermal processing on the stability of fumonisin B₂ in an aqueous system.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 1984-1987.
- 30- KELLER S.E. and SULLIVAN T.M. Identification of a variant of *Fusarium proliferatum* that hydrolyzes fumonisin B₁.
J. Agric. Food Chem., 1998, **46**: 2823-2826.
- 31- KELLER S.E., SULLIVAN T.M. and CHIRTEL S. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B₁: oxygen and pH.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1997, **19**: 305-309.
- 32- KNASMULLER S., BRESGEN N., KASSIE F., MERSCH-SUNDERMANN V., GELDERBLOM W., ZOHER E. and ECKL P.M. Genotoxic effects of three *Fusarium* mycotoxins, fumonisin B₁, moniliformin and vomitoxin in bacteria and in primary cultures of rat hepatocytes.
Mut. Res., 1997, **391**: 39-48.
- 33- KUIPER-GOODMAN T., SCOTT P.M., Mc EWEN N.P., LOMBAERT G.A. and NG W. Approches to the risk assessment of fumonisins in corn-based foods in Canada.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **392**: 369-393.
- 34- LE BARS P. and LE BARS J. Ecotoxinogénèse du *Fusarium moniliforme*: enveloppe des risques des fumonisines.
Cryptogamie, Mycol., 1995, **16**: 59-64.

- 35- LE BARS P., LE BARS J., DUPUY J., BOUDRA H. and CASSINI R. Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 517-521.
- 36- LEBEPE-MAZUR S., BAL H., HOPMANS E., MURPHY P. and HENDRICH S. Fumonisin B₁ is fetotoxic in rats.
Vet. Hum. Toxicol., 1995, **37**: 126-130.
- 37- LESLIE J.F. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*.
In *Fumonisin in Food*. Ed. L. Jackson, Plenum Press, New York, 1996, pp. 153-164.
- 38- LESLIE J.F., MARASAS W.F., SHEPARD G.S., SYDENHAM E.W., STOCKENSTROM S. and THIEL P.G. Duckling toxicity and the production of fumonisin and moniliformin by isolates in the A and E mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*).
Appl. Environ. Microbiol., 1996, **62**: 1182-1187.
- 39- LIM C.W., PARKER H.M., VESONDER F.F. and HASCHEK. Intravenous fumonisin B₁ induces cell proliferation and apoptosis in the rat.
Nat. Toxins, 1996, **4**: 34 - 41.
- 40- MARAGOS C.M. and RICHARD J.L., Quantitation and stability of fumonisins B₁ and B₂ in milk.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 1162-1167.
- 41- MARASAS W.F. Fumonisin: history, world-wide occurrence and impact.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **392**: 1-17.
- 42- MARIN S., SANCHIS V., RULL F., RAMOS A.J. and MAGAN N. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production.
J. Food Prot., 1998, **61**: 1489-1496.
- 43- MERRILL Jr A.H., WANG E., VALES T.R., SMITH E.R., SCHROEDER J.J., MENALDINO D.S., ALEXANDER C., CRANE H.M., XIA J., LIOTTA D.C., MEREDITH F.I. and RILEY R.T. Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis.
In *Fumonisin in Food*. Ed. L. Jackson, Plenum Press, New York, 1996, pp. 297-306.
- 44- MOBIO T.A., ANANE R., BAUDRIMONT I., CARRATU M.R., SHIER T.W., DANO S.D., VENO Y. and CREPPY E.E. Epigenetic properties of fumonisin B₁: cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells.
Toxicol. Appl. Pharmacol., 2000, **164**: 91 - 96.
- 45- MOBIO T.A., BAUDRIMONT I., SANNA A., SHIER T.W., SABOUREAU D., DANO S.D., VENO Y., STEYN P.S. and CREPPY E.E. Prevention by vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fumonisin B₁ in C6 glioma cells.
Arch. Toxicol., 2000, **74**: 112 - 119.

- 46- MURPHY P.A., HENDRICH S., HOPMANS E.C., HAUCK C.C., LU Z., BUSEMAN G. and MUNKVOL G. Effect of processing in fumonisin content of corn.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **392**: 323 - 334.
- 47- NELSON P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*.
Mycopathologia, 1992, **117**: 29-36.
- 48- NELSON P.E., JUBA J.H., ROSS P.F. and RICE L.G. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 522-525.
- 49- NELSON P.E., PLATTNER R.D., SHACKELFORD D.D. and DESJARDINS A.E. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58**: 984-989.
- 50- NORRED W.P. Fumonisins-mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*.
J. Toxicol. Environ. Health, 1993, **38**: 309-328.
- 51- NORRED W.P., VOSS K.A., BACON C.W. and RILEY R.T. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn.
Food Chem. Toxicol., 1991, **29**: 815-819.
- 52- NORRED W.P., VOSS K.A., RILEY R.T. and PLATTNER R.D. Fumonisin toxicity and metabolism studies at the USDA.
In *Fumonisins in Food*. Ed. L. Jackson, Plenum Press, New York, 1996, pp. 225-236.
- 53- OSWEILER G.D., ROSS P.F., WILSON T.M., NELSON P.E., WITTE S.T., CARSON T.L., RICE L.G. and NELSON H.A. Characterization of an epizootic edema in swine associated with fumonisin in corn screenings.
J. Vet. Diagn. Invest., 1992, **4**: 53-59.
- 54- PARK D.L., LOPEZ-GARCIA R., TRJILLO-PRECIADO S. and PRICE R.L. Reduction of risks associated with fumonisin contamination in corn.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **392**: 335 - 344.
- 55- PARK D.L., RUA S.M. Jr, MIROCHA C.J., ABD-ALLA E.S. and WENG C.Y. Mutagenic potentials of fumonisin contaminated corn following ammonia decontamination procedure.
Mycopathologia, 1992, **117**: 105-108.
- 56- PATEL S., HAZEL C.M., WINTERTON A.G. and GLEADLE A.E. Surveillance of fumonisins in UK maize-based foods and other cereals.
Food Addit. Contam., 1997, **14**: 187-191.
- 57- PELAGALLI A., BELISARIO M.A., SQUILLACIOTI C., DELLA MORTE R., D'ANGELO D., TAFURI S., LUCISANO A. and STAIANO N. The mycotoxin fumonisin B₁ inhibits integrin-mediated cell-matrix adhesion.
Biochimie, 1999, **81**: 1003 - 1008.

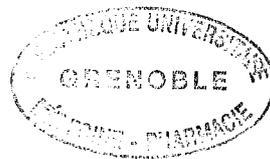
- 58- PESTKA J.J., AZCONA-OLIVERA J.I., PLATTNER R.D., MINERVINI F., DOKO M.B. and VISCONTI A. Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC.
J. Food Protect., 1994, **57**: 169-172.
- 59- PINELLI E., POUX N., GARREN L., PIPY B., CASTEGNARO M., MILLER D.J. and PFOHL-LESZKOWICZ A. Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B₁ stimulates cPLA(2) phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production.
Carcinogenesis, 1999, **20**: 1683 - 1688.
- 60- PITTET A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an updated review.
Rev. Méd. Vét., 1998, **149**: 479-492.
- 61- PLATTNER R.D. and BRANHAM B.E. Labeled fumonisins: production and use of fumonisin B₁ containing stable isotopes.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 525-532.
- 62- POHLAND A.E., Occurrence of fumonisins in the U.S. food supply.
In *Fumonisin in Food*. Ed. L. Jackson , Plenum Press, New York, 1996, pp. 19-26.
- 63- PRICE W.D., LOVELL R.A. and Mc CHESNEY D.G. Naturally occurring toxins in feedstuffs: center for veterinary medicine perspective.
J. Anim. Sci., 1993, **71**: 2556-2562.
- 64- PUJOL R., TORRES M., SANCHIS V. and CANELA R. Fate of fumonisin B₁ in corn kernel steeping water containing SO₂.
J. Agric. Food Chem., 1999, **47**: 276 - 278.
- 65- RICHARD J.L., MEERDINK G., MARAGOS C.M., TUMBLESON M., BORDSON G., RICE L.G. and ROSS P.F. Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material.
Mycopathologia, 1996, **133**: 123-126.
- 66- RILEY R.T., VOSS K.A., NORRED W.P., SHARMA R.P., WANG E. and MERRILL Jr A.H. Fumonisin: mechanism of mycotoxicity.
Rev. Méd. Vét., 1998, **149**: 617-626.
- 67- ROSS P.F. What are we going to do with this dead horse?
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 491-494.
- 68- ROSS P.F., LEDET A.E., OWENS D.L., RICE L.G., NELSON H.A., OSWEILER G.D. and WILSON T.M. Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins.
J. Vet. Diagn. Invest., 1993, **5**: 69-74.
- 69- ROSS P.F., NELSON P.E., OWENS D.L., RICE L.G., NELSON H.A. and WILSON T.M. Fumonisin B₂ in cultured *Fusarium proliferatum*, M-6104, causes equine leukoencephalomalacia.
J. Vet. Diagn. Invest., 1994, **6**: 263-265.

- 70- ROSS P.F., RICE L.G., OSWEILER G.D., NELSON P.E., RICHARD J.L. and WILSON T.M. A review and update of animal toxicoses associated with fumonisin-contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates.
Mycopathologia, 1992, **117**: 109-114.
- 71- ROSS P.F., RICE L.G., PLATTNER R.D., OSWEILER G.D., WILSON T.M., OWENS D.L., NELSON H.A. and RICHARD J.L. Concentrations of fumonisin B₁ in feeds associated with animal health problems.
Mycopathologia, 1991, **114**: 129-135.
- 72- ROSS P.F., RICE L.G., REAGOR J.C., OSWEILER G.D., WILSON T.M., NELSON H.A., OWENS D.L., PLATTNER R.D., HARLIN K.A., RICHARD J.L., COLVIN B.M. and BANTON M.I. Fumonisin B₁ concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases.
J. Vet. Diagn. Invest., 1991, **3**: 238-241.
- 73- SANCHIS V., ABADIAS M., ONCINS L., SALA N., VINAS N. and CANELA R. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the spanish market.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, **60**: 2147-2148.
- 74- SANCHIS V., CASTEL I., MARIN S., SANZ D., CANELA R., MAGAN N. and RAMOS A.J. Control of growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum* isolates in moist maize with propionate preservatives.
Food Addit Contam., 1999, **16**: 555 - 563.
- 75- SCOTT P.M. Fumonisin.
J. Food Microbiol., 1993, **18**: 257-270.
- 76- SCOTT P.M., DELGADO T., PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L. and MILLER J.D. Determination of fumonisins in milk.
J. Environ. Sci. Health B, 1994, **29**: 989-998.
- 77- SCOTT P.M. and LAWRENCE G.A. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 541-545.
- 78- SCOTT P.M. and LAWRENCE G.A. determination of hydrolysed fumonisin B₁ in alkali-processed corn food.
Food Addit. Contam., 1996, **13**: 823 - 832.
- 79- SELIM M.I., EL-SHARKAWY S.H. and POPENDORF W.J. Supercritical fluid extraction of fumonisin B₁ from grain dust.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 3224-3229.
- 80- SEO J.A., KIM J.C. and LEE Y.W. Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by *Fusarium oxysporum*.
J. Nat. Prod., 1996, **59**: 1003-1005.

- 81- SHEPARD G.S. and SNIJMAN P.W. Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B₂ in a non-human primate.
Food Chem. Toxicol., 1999, **37**: 111-116.
- 82- SHEPARD G.S., THIEL P.G., STOCKENSTROM S. and SYDENHAM E.W. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products.
J.A.O.A.C., 1996, **79**: 671-687.
- 83- SHEPARD G.S., THIEL P.G. and SYDENHAM E.W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B₁ in rats.
Food Chem. Toxicol., 1992, **30**: 277-279.
- 84- SHETTY P.H. and BHAT R.V. Natural occurrence of fumonisin B₁ and its co-occurrence with aflatoxin B₁ in indian sorghum, maize, and poultry feeds.
J. Agric. Food Chem., 1997, **45**: 2170-2173.
- 85- SIAME B.A., MPUCHANE S.F., GASHE B.A., ALLOTEY J. and TEFFERA G. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁ and zearalenone in foods and feeds in Botswana.
J. Food Prot., 1998, **61**: 1670-1673.
- 86- SMITH J.S. and THAKUR R.A. Occurrence and fate of fumonisins in beef.
Adv. Exp. Med. Biol., 1996, **392**: 39-55.
- 87- SOLFRIZZO M., AVANTAGGIATO G. and VISCONTI A. Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker of fumonisin exposure.
J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 1997, **692**: 87 - 93.
- 88- STEYN P.S. The biosynthesis of mycotoxins.
Rev. Méd. Vét., 1998, **149**: 469-478.
- 89- SYDENHAM E.W., SHEPARD G.S., THIEL P.G., BIRD C. and MILLER B.M. Determination of fumonisins in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 159-164.
- 90- SYDENHAM E.W., SHEPARD G.S., THIEL P.G., STOCKENSTROM S., SNIJMAN P.W. and VAN SCHALKWYK D.J. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study.
J.A.O.A.C., 1996, **79**: 688-696.
- 91- SYDENHAM E.W., STOCKENSTROM S., THIEL P.G., RHEEDER J.P., DOKO M.B., BIRD C. and MILLER B.M. Polyclonal antibody-based ELISA and HPLC methods for the determination of fumonisins in corn: a comparative study.
J. Food Protect., 1996, **59**: 893-897.
- 92- SYDENHAM E.W., THIEL P.G. and VLEGGAR R. Physicochemical data for some selected *Fusarium* toxins.
J.A.O.A.C., 1996, **79**: 1365-1379.

- 93- SYDENHAM E.W., VAN DER WESTHUIZEN L., STOCKENSTROM S., SHEPARD G.S. and THIEL P.G. Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments.
Food Addit. Contam., 1994, **11**: 25-32.
- 94- THAKUR R.A. and SMITH J.S. Determination of fumonisin B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed, and meat, using HPLC.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 1047-1052.
- 95- THIEL P.G., MARASAS W.F.O., SYDENHAM E.W., SHEPARD G.S., GELDERBLUM W.C.A. and NIEUWENHUIS J.J. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57**: 1098-1093.
- 96- TOLLESON W.H., MELCHIOR W.B., MORRIS S.M., Mc GARRITTY L.J., DOMON O.E., MUSKHELISHVILI L., JAMES S.J. and HOWARD P.C. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B₁ in human keratinocytes, fibroblasts, oesophageal epithelial cells and hepatoma cells.
Carcinogenesis, 1996, **17**: 239 - 249.
- 97- VIQUEZ O.M., CASTELL-PEREZ M.E. and SHELBY R.A. Occurrence of fumonisin B₁ in maize grown in Costa Rica.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 2789-2791.
- 98- VISCONTI A., BOENKE A., DOKO M.B., SOLFRIZZO M. and PASCALE M. Occurrence of fumonisins in Europe and the BCR-Measurements and testing projects.
Nat. Toxins, 1995, **3**: 269-274.
- 99- VISCONTI A. and DOKO M.B. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe.
J.A.O.A.C., 1994, **77**: 546-550.
- 100- VISCONTI A., SOLFRIZZO M., DOKO M.B., BOENKE A. and PASCALE M. Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in gamma-irradiated maize.
Food Addit. Contam., 1996, **13**: 929-938.
- 101- WANG D.S., LIANG YX, NGUYEN T.C., LE D.D., TANAKA T. and UENO Y. Natural co-occurrence of *Fusarium* toxins and aflatoxin B₁ in corn for feed in north Vietnam.
Nat. Toxins, 1995, **3**: 445-449.
- 102- WILKES J.G., SUTHERLAND J.B., CHURCHWELL M.I. and WILLIAMS A.J. Determination of fumonisins B₁, B₂, B₃, and B₄ by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection.
J. Chromatogr., 1995, **695**: 319-323.

- 103- WILSON T.M., ROSS P.F., OWENS D.L., RICE L.G., GREEN S.A. JENKINS S.J. and NELSON H.A. Experimental reproduction of ELEM.
Mycopathologia, 1992, **117**: 115-120.
- 104- WILSON T.M., ROSS P.F., RICE L.G., OSWEILER G.D., NELSON H.A., OWENS D.L., PLATTNER R.D., REGGIARDO C., NOON T.H. and PICKRELL J.W. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia.
J. Vet. Diagn. Invest., 1990, **2**: 213-216.
- 105- YAMASHITA A., YOSHIZAWA T, AIURA Y., SANCHEZ P.C., DIZON E.I., ARIM R.H. and SARDJONO. *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn in Southeast Asia.
Biosci. Biotech. Biochem., 1995, **59**: 1804-1807.
- 106- YEUNG J.M., PRELUSKY D.B., SAVARD M.E., DANG B.D. and ROBINSON L.A. Sensitive immunoassay for fumonisin B₁ in corn.
J. Agric. Food Chem., 1996, **44**: 3582-3586.
- 107- YOSHIZAWA T., YAMASHITA A. and LUO Y. Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human oesophageal cancer in China.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, **60**: 1626-1629.





Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



THESE SOUTENUE PAR : DUCRET Céline

[Données personnelles retirées de la version diffusée]

RESUME : Une nouvelle classe de mycotoxines : les fumonisines

Les mycotoxines sont des composés naturels élaborés par de nombreuses espèces de moisissures. Leur implication dans diverses pathologies animales est bien connue ; cependant, leur incidence sur la santé humaine reste toujours d'actualité et fait l'objet de nombreuses recherches.

Fin des années 80, une nouvelle famille de toxines fongiques est caractérisée : les fumonisines, suspectées d'être à l'origine d'une maladie nerveuse touchant les chevaux. La fumonisine B₁ (FB₁) est la plus abondante de ce groupe et est produite essentiellement par *Fusarium moniliforme* et *proliferatum* ; elle contamine les céréales, surtout le maïs.

FB₁ est un dérivé polyacétoacide qui, une fois absorbé par voie orale, présente une faible biodisponibilité et est rapidement éliminé non métabolisé dans les fèces. Toutefois, FB₁ exerce sa toxicité à faible dose (10 µg/g) au niveau d'organes cibles : le foie et les reins. De ce fait, le développement de techniques analytiques rapides et fiables tels la chromatographie liquide haute performance ou les tests ELISA, pouvant détecter et doser de faibles quantités de fumonisines dans les denrées alimentaires, a permis d'élargir le contrôle des productions céréalières. De nombreux travaux concernent la toxicité aiguë et chronique des fumonisines, notamment chez les équidés (leucoencéphalomalacie), les porcs (oedème pulmonaire aigu) et les rongeurs (hépatotoxique et néphrotoxique, carcinogénicité). FB₁ est un analogue structural de la sphinganine et est connue pour être un inhibiteur de la N-acyltransférase ou céramide synthétase. Chez l'homme, des données épidémiologiques montrent une relation entre le développement de cancer oesophagien et la présence dans l'alimentation de fumonisines. L'agence internationale pour la recherche contre le cancer (IARC) a classé les toxines de *F. moniliforme*, et notamment les fumonisines, comme "possibles cancérigènes humains" (classe 2B) et les limites réglementaires de teneurs en fumonisines dans les denrées mises sur le marché sont en cours d'examen.

MOTS-CLES : Fumonisines, Mycotoxines, Maïs, Leucoencéphalomalacie, Sphingolipides