

<b>1 LES FUMONISINES ET LES MYCOTOXICOSES QU'ELLES DETERMINENT .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1 STRUCTURE .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES.....</b>	<b>21</b>
1.2.1 PROPRIETES PHYSIQUES .....	21
1.2.2 PROPRIETES CHIMIQUES .....	22
<b>1.3 STABILITE .....</b>	<b>22</b>
1.3.1 LE TRAITEMENT THERMIQUE .....	22
1.3.2 LE TRAITEMENT BIOLOGIQUE .....	22
1.3.3 LE TRAITEMENT CHIMIQUE .....	23
1.3.4 LE TRAITEMENT MECANIQUE.....	23
<b>1.4 LA TOXINOGENESE DE <i>F. MONILIFORME</i>.....</b>	<b>23</b>
1.4.1 LES VOIES DE BIOSYNTHÈSE .....	23
1.4.2 LES FACTEURS PHYSICOCHIMIQUES INFLUANT SUR LA TOXINOGENESE.....	23
1.4.2.1 les facteurs intrinsèques.....	24
1.4.2.2 les facteurs extrinsèques .....	24
<b>1.5 LES MYCOTOXICOSES .....</b>	<b>25</b>
1.5.1 CHEZ LES EQUIDES.....	26
1.5.1.1 la leucoencéphalomalacie équine .....	26
1.5.1.2 l'hépatotoxicose.....	26
1.5.1.3 Le syndrome duodénite/jéjunite proximale .....	27
1.5.2 CHEZ LES PORCINS .....	27
1.5.2.1 l'oedème pulmonaire porcin.....	27
1.5.2.2 l'hépatotoxicose.....	27
1.5.3 CHEZ LES VOLAILLES .....	28
1.5.3.1 toxicité pour l'embryon .....	28
1.5.3.2 toxicité chez le jeune .....	29
1.5.4 CHEZ LES AUTRES ANIMAUX.....	29
1.5.4.1 les ruminants .....	29
1.5.4.2 les rongeurs .....	30
1.5.5 LES RISQUES POUR L'HOMME .....	30
<b>1.6 CINETIQUE ET MECANISMES D'ACTION DES FUMONISINES.....</b>	<b>31</b>
1.6.1 LA CINETIQUE .....	31
1.6.1.1 absorption .....	31
1.6.1.2 distribution .....	31
1.6.1.2.1 plasmatique .....	31
1.6.1.2.2 tissulaire .....	32
1.6.1.3 métabolisme .....	32
1.6.1.3.1 in vivo .....	32
1.6.1.3.2 in vitro .....	33

1.6.1.3.3	effets des fumonisines sur les enzymes de biotransformation.....	33
1.6.1.4	élimination.....	34
1.6.2	MECANISME D'ACTION .....	35
1.6.2.1	nature et rôles des sphingolipides.....	35
1.6.2.2	action des fumonisines sur la biosynthèse des sphingolipides .....	36
1.6.2.3	conséquences.....	37
1.6.2.4	autres mécanismes.....	38

## **2 LES BIOTRANSFORMATIONS.....38**

<b>2.</b>	<b>1SCHEMA GENERAL DES BIOTRANSFORMATIONS .....</b>	<b>38</b>
2.1.1	LA PHASE I.....	39
2.1.2	LA PHASE II .....	39
<b>2.2</b>	<b>LES MONOOXYGENASES A CYTOCHROME P450 .....</b>	<b>40</b>
2.2.1	L'ENZYME.....	40
2.2.1.1	structure.....	40
2.2.1.2	les propriétés catalytiques .....	41
2.2.1.3	les isoenzymes du cytochrome P450.....	42
2.2.1.4	La nomenclature .....	42
2.2.2	LES FACTEURS DE VARIATION .....	43
2.2.2.1	Influence du sexe.....	43
2.2.2.2	Influence de l'âge .....	43
2.2.2.3	Influence de l'espèce : étude des cytochromes P450 d'oiseaux .....	43
<b>2.3</b>	<b>LES ENZYMES DE CONJUGAISON DE LA PHASE II .....</b>	<b>45</b>
2.3.1	LES UDP GLUCURONYL TRANSFERASES .....	45
2.3.2	LES GLUTATHION S-TRANSFERASES.....	45
<b>2.4</b>	<b>LES FACTEURS DE MODIFICATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES .....</b>	<b>46</b>
2.4.1	FACTEURS ENDOGENES .....	46
2.4.1.1	Influence du sexe.....	46
2.4.1.2	Influence de l'espèce .....	46
2.4.2	FACTEURS EXOGENES .....	48
2.4.2.1	l'induction .....	48
2.4.2.1.1	généralités .....	48
2.4.2.1.2	les mécanismes de l'induction.....	49
2.4.2.1.3	l'induction chez les oiseaux .....	50
2.4.2.2	l'inhibition .....	51
2.4.2.2.1	les inhibitions réversibles .....	51
2.4.2.2.2	les inhibitions par formation d'un complexe avec des métabolites activés (MI) .....	51
2.4.2.2.3	les inhibitions nécessitant une catalyse .....	52

<b>3 REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 APPAREILLAGE.....</b>	<b>56</b>
<b>3.2 REACTIFS.....</b>	<b>56</b>
<b>3.3 CULTURE DES FUMONISINES.....</b>	<b>56</b>
<b>4 TRAITEMENT DES ANIMAUX.....</b>	<b>57</b>
<b>5 PREPARATION DES FRACTIONS CELLULAIRES.....</b>	<b>57</b>
<b>6 DOSAGE DES PROTEINES.....</b>	<b>58</b>
<b>7 DOSAGE DES CYTOCHROMES B5 ET P450.....</b>	<b>59</b>
<b>8 DOSAGES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES .....</b>	<b>60</b>
<b>8.1 DETERMINATION DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION.....</b>	<b>60</b>
<b>8.2 ACTIVITE DES N-DEMETHYLASES .....</b>	<b>61</b>
<b>8.3 ACTIVITE DES O-DEALKYLASES .....</b>	<b>63</b>
<b>8.4 ACTIVITE DE L'ANILINE HYDROXYLASE.....</b>	<b>65</b>
<b>8.5 ACTIVITE DE L'UDPG .....</b>	<b>67</b>
<b>8.6 ACTIVITE DES GST .....</b>	<b>67</b>
<b>9 EFFETS DU TRAITEMENT SUR LES CANARDS.....</b>	<b>72</b>
<b>10 EFFETS DES FUMONISINES SUR LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION .....</b>	<b>73</b>
<b>10.1 LES ENZYMES HEPATIQUES .....</b>	<b>73</b>
<b>10.2 LES ENZYMES RENALES .....</b>	<b>82</b>

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

βNF : β-naphtoflavone  
3MC : 3-méthylcholanthrène  
ASAT : aspartate amino transférase  
CDNB : 1-chloro 2,4-dinitrobenzène  
CK : créatine kinase  
DCNB : 1,2-dichloro 4-nitrobenzène  
EBI : inhibiteurs de la biosynthèse d'ergostérol  
ELEM : leucoencéphalomalacie équine  
EROD : éthoxy résorufine O-dééthylase  
FB1 : fumonisine B1  
GGT : gamma glutamyl transférase  
GMQ : gain moyen quotidien  
GST : glutathion S-transférases  
LDH : lactate déshydrogénase  
MFO : monooxygénases à fonction mixte  
MROD : méthoxy résorufine O-déméthylase  
PAH : hydrocarbures aromatiques polycycliques  
PB : phénobarbital  
PCB : polychlorobiphényles  
PCN : pregnénolone 16- $\alpha$  carbonitrile  
PKC : protéine kinase C  
PROD : Pentoxy résorufine dépentylose  
TCA : acide trichloro acétique  
UDPGA : acide uridine 5'diphosphoglucuronique

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

- Figure 1 : Structure des fumonisines (p.20)
- Figure 2 : Comparaison des structures de la FB1 et de la sphingosine (p.34)
- Figure 3 : Voie de biosynthèse des sphingolipides (p.36)
- Figure 4 : Schéma général des biotransformations (p.38)
- Figure 5 : Structure de l'hémoprotéine du cytochrome P450 (p.39)
- Figure 6 : Cycle catalytique du cytochrome P450 (p.40)
- Figure 7 : Exemple type de gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines (p.58)
- Figure 8 : Spectres d'absorption des cytochromes b5 et P450 chez le rat (p.59)
- Figure 9 : Gamme d'étalonnage des activités N-déméthylases (p.61)
- Figure 10 : Activité des N-déméthylases en fonction de la concentration en aminopyrine (p.62)
- Figure 11 : Activité des N-déméthylases en fonction de la concentration en éthylmorphine (p.62)
- Figure 12 : Gamme d'étalonnage pour l'activité des O-dééthylases (p.63)
- Figure 13 : Activité de la MROD en fonction de la concentration en méthoxy résorufine (p.64)
- Figure 14 : Gamme d'étalonnage pour le dosage de l'aniline hydroxylase (p.65)
- Figure 15 : Cinétique de la formation du CDNB-glutathion (p.67)
- Figure 16 : Evolution de l'activité de l'éthylmorphine N-déméthylase en fonction du temps d'incubation (p.73)
- Figure 17 : Activités hépatiques des N-déméthylases (pour l'aminopyrine, la benzphétamine, l'érythromycine, l'éthylmorphine et la N-nitroso diméthylamine) et de l'aniline hydroxylase (p.74)
- Figure 18 : Activités hépatiques des O-déalkylases (EROD, MROD et PROD) et des enzymes de phase II (UDPGA et GST) (p.75)
- Figure 19 : Activité de l'éthylmorphine N-déméthylase en fonction de la concentration en substrat pour les témoins et la dose 45 mg/kg/j (p.76)
- Figure 20 : Evolution de l'activité de la benzphétamine N-déméthylase en fonction du temps d'incubation (p.77)
- Figure 21 : Activité de la benzphétamine N-déméthylase en fonction de la concentration en substrat (p.77)

Figure 22 : Structures du 3MC, du thiabendazole, de la canthaxanthine et de la fumonisine B1 (p.80)

Figure 23 : Activités rénales des N-déméthylases, des O-déalkylases et de la GST (p.82)

## TABLEAUX

Tableau I : Production de FB1 par des espèces du genre *Fusarium* autres que *F.moniliforme* (p.23)

Tableau II : Production de FB1 par des souches de *F.moniliforme* isolées dans des grains de maïs du sud-ouest de la France (p.23)

Tableau III : Quantité de fumonisine produite en fonction du substrat utilisé pour la culture, après 24 jours d'incubation à 25°C à l'obscurité (p.24)

Tableau IV : Pourcentages de mortalité des embryons en fonction de la dose injectée et du moment d'incubation (p.27)

Tableau V : Distribution de fumonisine marquée en 24 heures chez des singes vervets (p.31)

Tableau VI : Activités hépatiques chez des rats traités à la fumonisine B1 (p.33)

Tableau VII : Activités rénales chez des rats traités à la fumonisine B1 (p.33)

Tableau VIII : Comparaison des concentrations microsomaux en protéines chez le canard et le rat (p.43)

Tableau IX : Formes inductibles de cytochrome P450 chez le poulet (p.43)

Tableaux X et XI : Activités enzymatiques chez différentes espèces (p.46)

Tableau XII : Inducteurs spécifiques des différentes isoenzymes de P450 (p.48)

Tableau XIII : Inhibiteurs de cytochromes P450 et leurs mécanismes d'action (p.51)

Tableau XIV : Doses de traitement des 4 lots d'animaux (p.56)

Tableau XV : Influence de la température d'incubation sur les activités enzymatiques (p.60)

Tableau XVI : Paramètres biochimiques des différents groupes d'animaux (p.71)

Tableau XVII : Effets de la FB1 sur les concentrations en cytochromes P450 et b5 (p.72)

Tableau XVIII : Paramètres cinétiques de l'activité éthylmorphine N-déméthylase chez les animaux témoins et traités par 45 mg/kg/j de FB1 (p.76)

Tableau XIX : Paramètres cinétiques de l'activité benzphétylamine N-déméthylase chez les animaux traités par 45 mg/kg/j de FB1 (p.78)

## INTRODUCTION

Les fumonisines sont des mycotoxines principalement produites par *Fusarium moniliforme*, une moisissure contaminant essentiellement le maïs.

Bien que l'on connaisse les mycotoxicoses que provoque leur ingestion (la leucoencéphalomalacie chez le cheval et l'œdème pulmonaire chez le porc), le mécanisme d'action des fumonisines reste méconnu.

Comme tous les xénobiotiques, ces mycotoxines subissent, au cours du phénomène d'élimination, des biotransformations, notamment au niveau hépatique, mettant en jeu un équipement enzymatique. Or, il est montré, chez le rat, que les fumonisines peuvent modifier l'activité de ces enzymes, aussi bien dans le sens d'une activation que d'une inhibition. Cette perturbation du processus de détoxicification pourra ainsi être à l'origine d'une apparition ou d'une augmentation des effets toxiques d'autres xénobiotiques ou encore d'une modification de l'efficacité d'agents thérapeutiques.

Les données concernant l'équipement enzymatique des oiseaux restent rares. Néanmoins, l'étude des effets de la FB1 sur les enzymes de biotransformation a été conduite chez le canard car peu d'informations sont disponibles pour cette espèce animale, par ailleurs fortement exposée à ces composés dans notre région, grande productrice de maïs largement contaminé.



# PREMIERE PARTIE :

## DONNEES

## BIBLIOGRAPHIQUES



# 1 LES FUMONISINES ET LES MYCOTOXICOSES QU'ELLES DETERMINENT

Les fumonisines sont des mycotoxines dont le principal producteur est un micromycète du genre *Fusarium* : *F.moniliforme* Sheldon. Elles sont fréquemment retrouvées dans le maïs et ses sous-produits.

Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les fumonisines sont connues pour leurs effets toxiques chez le cheval (leucoencéphalomalacie équine) et le porc (œdème aiguë du poumon). Mais il semblerait que la FB1, principale fumonidine, soit en fait responsable de nombreuses pathologies touchant les élevages, voire l'homme.

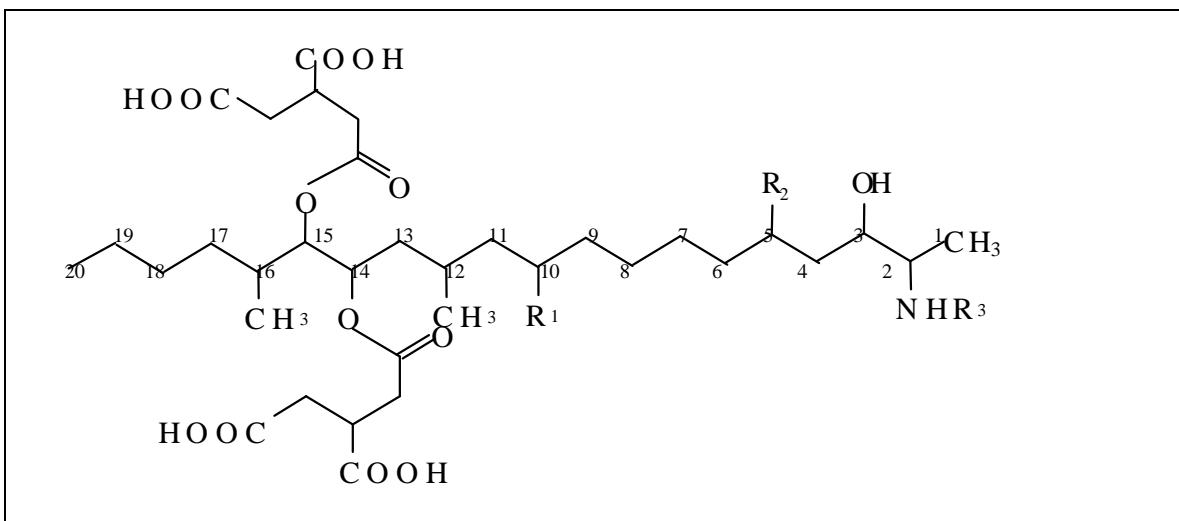
Nous présenterons, dans cette partie, ces mycotoxines avant d'envisager les diverses mycotoxicoses et leurs causes.

## 1.1 Structure

La structure plane des fumonisines A1, A2, B1, B2 a été élucidée en 1988 par Bezuidenhout et ses collaborateurs [8]. La FB1 est un diester de l'acide 1,2,3 propane tricarboxylique et du 2-amino-12,16-diméthyl 3,5,10,14,15-pentahydroxyicosane (Figure 1). La FA1 se différencie par une acétylation de la fonction amine, alors que les fumonisines B2, B3 et A2 sont des analogues deshydroxylés de FB1 et FA1.

L'iso-FB1, nouvelle fumonidine récemment isolée, se distingue de la FB1 par la seule présence d'une fonction hydroxyle en C4 au lieu de C5 [42].

Malgré l'existence de plusieurs carbones asymétriques, les informations concernant la stéréochimie de la molécule restent peu nombreuses et contradictoires [81]. L'étude de la structure tridimensionnelle de ces composés révèle une étroite relation entre les groupes amine et acide carboxylique laissant imaginer que les fumonisines possèdent des propriétés chélatrices [6].



FUMONISINE	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
A1	OH	OH	CH <sub>3</sub> CO
A2	H	OH	CH <sub>3</sub> CO

Figure 1 : Structure des fumonisines

## 1.2 Propriétés physiques et chimiques

### 1.2.1 Propriétés physiques

Les fumonisines se présentent sous la forme de solides amorphes. La FB1 possède un poids moléculaire de 722 g/mol. Son point de fusion se situe entre 103 et 105 °C. Ces molécules ne possédant pas de groupements chromophores, elles n'absorbent pas en lumière UV, ni en lumière visible et ne sont pas fluorescentes. Ce sont des composés très polaires, solubles dans l'eau, plus encore dans le méthanol et le mélange acetonitrile-eau, mais insolubles dans les solvants non polaires [21].

## 1.2.2 Propriétés chimiques

Présentant une structure d'ester, les fumonisines sont hydrolysables par chauffage en milieu acide ou basique. Elles libèrent alors l'acide propane tricarboxylique et l'aminopolyol correspondant. Des réactions d'acétylation et de méthylation sont également possibles sur les fonctions alcool et amine.

## 1.3 Stabilité

Du fait de la présence de fumonisines à l'état naturel dans les denrées destinées aux animaux et à l'homme, plusieurs méthodes de détoxification ont été envisagées. Ainsi les effets des traitements thermiques, biologiques, chimiques et mécaniques ont été testés dans le but de réduire la contamination du maïs par la FB1.

### 1.3.1 le traitement thermique

Dans les diverses études menées [32], 3 paramètres ont été pris en compte : la température, la durée, le pH. Les différents résultats montrent que :

- une température inférieure à 125 °C maintenue pendant 60 mn n'apporte qu'une diminution de 27% de la teneur en FB1
- une température de 150 °C permet une réduction de 80 à 90 % à pH 4, 18 à 30% à pH 7 et 40 à 52% à pH 10
- pour une température supérieure à 175 °C, plus de 80% de la FB1 est totalement détruite.

Les fumonisines sont donc des composés thermostables qui résistent aux procédés thermiques les plus couramment utilisés pour stériliser les denrées alimentaires.

### 1.3.2 le traitement biologique

Bothast et ses collaborateurs (1992) ont montré que la fermentation par des levures de maïs naturellement contaminé par FB1 pour la production d'éthanol n'apportait qu'une légère diminution de la teneur en toxine.

### **1.3.3 le traitement chimique**

L'action de l'ammoniaque (2% à température ambiante et pression atmosphérique) permet une réduction non négligeable de la contamination, mais reste sans conséquence sur la toxicité du maïs chez le rat [56].

L'eau chaude ,associée à un traitement thermique (24 heures à 25°C) provoque, sur des grains de maïs contaminés, une réduction de 95% de la concentration en FB1. Cette diminution est liée à la perte du péricarpe où se localise principalement la toxine. Toutefois, l'aliment reste毒ique chez le rat [81].

### **1.3.4 le traitement mécanique**

En éliminant les fines particules de maïs (inférieures à 3 mm), on peut atteindre une réduction du niveau de contamination de 26 à 69 % [79].

## **1.4 La toxinogénèse de *F. moniliforme***

### **1.4.1 Les voies de biosynthèse**

Les voies exactes de biosynthèse restent encore inconnues à ce jour. Cependant, deux principales hypothèses prédominent.

Etant donné la structure des fumonisines, très proche de celle des bases sphingoïdes, il a été proposé un schéma de synthèse identique à celui des sphingolipides [62].

D'autre part, l'utilisation d'isotopes radioactifs en milieu de culture liquide a également montré que la méthionine, le glutamate et lalanine étaient incorporés au squelette hydrocarboné des fumonisines, ce qui suggère l'existence d'une voie de biosynthèse empruntant la voie des polycétoacides [62, 13].

### **1.4.2 Les facteurs physicochimiques influant sur la toxinogénèse**

La production des mycotoxines est influencée à la fois par des facteurs intrinsèques (nature et origine de l'espèce et de la souche) et des facteurs extrinsèques comme la température, la disponibilité en eau, le confinement et la nature du substrat.

#### 1.4.2.1 LES FACTEURS INTRINSEQUES

1. l'espèce : la FB1 est principalement produite par *Fusarium moniliforme* mais également par d'autres espèces du même genre (Tableau I). Le genre *Alternaria* synthétise aussi cette mycotoxine mais en quantité bien inférieure [81].

Espèce du genre Fusarium testée	% de souches synthétisant la FB1	Quantité de FB1 produite
<i>F. proliferatum</i>	61	155 à 2936 ppm
<i>F. antophilum</i>	18	58 à 613 ppm
<i>F. dlamini</i>	56	42 à 82 ppm
<i>F. napiforme</i>	15	16 à 479 ppm
<i>F. nygamai</i>	37	17 à 7162 ppm

Tableau I : Production de FB1 par des espèces du genre Fusarium autres que *F. moniliforme* [81]

2. la souche : la production de FB1 varie avec la souche productrice. Ainsi, sur un groupe de 25 souches fraîchement isolées de 37 échantillons de grains de maïs originaires du sud-ouest de la France, on a pu observer des taux de mycotoxine très variables (Tableau II) [38].

Taux de FB1 produite ( $\mu\text{g/g}$ )	% de souches
de 50 à 200	12
de 200 à 800	4
de 800 à 3200	68
plus de 3200	16

Tableau II : Production de FB1 par des souches de *F. moniliforme* isolées dans des grains de maïs du sud-ouest de la France [38]

#### 1.4.2.2 LES FACTEURS EXTRINSEQUES

1. la température : la toxinogénèse est beaucoup plus étroitement liée à la température que ne l'est la croissance du champignon. La production maximale de fumonisine est atteinte à 20°C [38, 2]. Elle décroît pour des températures voisines pour chuter brutalement vers 10 et 30 °C. À 35 °C, en dépit d'une croissance mycélienne régulière, aucune trace de FB1 n'est détectée au bout de 10 semaines.

2. l'activité hydrique (aw) et la teneur en eau : pour obtenir une production maximale de FB1, le maïs doit avoir une teneur en eau de 32% [38]. Comme la température, l'activité hydrique est un facteur déterminant pour la toxinogenèse. Pour une valeur inférieure à 0,95 la production se trouve fortement diminuée, voire nulle pour des valeurs inférieures à 0,9 [46]. Enfin, une étude des variations de production de FB1 en fonction des deux variables température et activité hydrique montre que les résultats optima sont obtenus avec une température de 30 °C à 0,97 aw pour *F. moniliforme* et 15 °C à 0,97 aw pour *F proliferatum*. [45]

le confinement : après 10 semaines de culture confinée la production de FB1 reste nulle. Cela suggère que le stockage en atmosphère confinée, sous atmosphère modifiée (enrichie en N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>) ou en anaérobiose (ensilage) permettrait d'inhiber la synthèse des fumonisines.

3. le substrat : le tableau suivant montre que la quantité de fumonidine produite varie fortement en fonction du substrat utilisé pour la culture. Il apparaît que le maïs reste, de loin, le meilleur substrat [81].

Substrat utilisé pour la culture	FB1 produite (µg/g)
Maïs	10242
Riz non moulu	206
Aliments pour rats de laboratoire	34
Cacahuètes	≤ 5
Soja	≤ 5

Tableau III : Quantité de fumonidine produite en fonction du substrat utilisé pour la culture, après 24 jours d'incubation à 25°C à l'obscurité [81]

## 1.5 les mycotoxicoses

Les fumonisines sont responsables de nombreuses maladies animales. Les plus connues restent la leucoencéphalomalacie équine et l'œdème aigü du poumon chez le porc. Mais il semblerait que ces intoxications puissent avoir d'autres conséquences pathologiques chez de nombreuses espèces, y compris chez l'homme où une activité carcinogène est suspectée.

## 1.5.1 chez les équidés

Chez le cheval, on connaît deux formes dues à l'ingestion de maïs ou de ses sous-produits contaminés par *Fusarium moniliforme*. Suivant l'importance de la dose ingérée, l'animal présentera des signes nerveux (leucoencéphalomalacie équine) ou des troubles hépatiques (hépatotoxicose). Une troisième pathologie moins connue, le syndrome duodénite-jéjunite proximale, semblerait être, en partie, provoquée par la consommation de mycotoxine [28].

### 1.5.1.1 LA LEUCOENCEPHALOMALACIE EQUINE

Le premier cas cité dans la littérature remonte à 1850 aux Etats-Unis. Depuis, de nombreux cas ont été répertoriés sur les différents continents. En France, l'affection semble prédominer dans le quart sud-ouest (20 morts entre 1994 et 1996) [5].

Les symptômes sont variables suivant l'individu, la durée d'exposition et la dose ingérée. Même si la dose minimale provoquant l'apparition des symptômes reste inconnue, on sait que l'administration de 20 doses de 1 à 4 mg de FB1/kg PV sur 29 jours par voie orale, ou de 6 doses de 0,125 mg/kg sur 7 jours par voie veineuse, suffit à reproduire la maladie [43].

Le tableau clinique est dominé par des désordres nerveux (hyperesthésie, ataxie, amaurose, hyperexcitabilité, marche en cercle, pousser au mur...) accompagnés d'anorexie, d'apathie et d'un ictere. Ces symptômes évoluent rapidement vers des crises convulsives ou un état comateux, la mort survenant au bout de quelques heures à quelques jours. L'animal peut également mourir sans révéler aucun symptôme [22].

On peut noter quelques modifications biochimiques, notamment pour les marqueurs hépatiques : augmentation des PAL, GGT, ASAT, acides biliaires et de la bilirubine totale. Le métabolisme des sphingolipides est également altéré puisque la concentration sérique en sphinganine libre est en nette augmentation, alors que celle des sphingolipides diminue.

Les lésions observées à l'autopsie seront essentiellement celles de l'encéphale. Celui-ci, très oedématisé, présente des foyers de nécrose dans la substance blanche, parfois dans la substance grise. L'observation microscopique de ces foyers de liquéfaction montre une démyélinisation massive et diffuse. Des lésions de stéatose et de stase biliaire peuvent également être présentes sur le foie.

### 1.5.1.2 L'HEPATOTOXICOSE

Après l'ingestion de doses plus élevées (6 doses de 2,5 mg de FB1/kg PV sur 7 jours), le tableau clinique est dominé par des troubles hépatiques se traduisant par un ictere, accompagné d'apathie, d'anorexie et de constipation. Tous les marqueurs biochimiques d'une souffrance hépatique et d'une cholestase sont augmentés. A l'autopsie, on notera une dégénérescence

hépatocellulaire accompagnée d'une infiltration de cellules inflammatoires. De plus, l'existence de lésions proches de celles de l'ELEM reste possible.

#### **1.5.1.3 LE SYNDROME DUODENITE/JEJUNITE PROXIMALE**

Les fumonisines sembleraient être impliquées dans l'apparition de ce syndrome dont les principales manifestations sont une dépression et un reflux gastrique important, parfois hémorragique [28]. A l'autopsie, les lésions sont limitées au duodenum et au jéjunum proximal, avec des séreuses et des muqueuses rouges, des pétéchies et des ecchymoses.

### **1.5.2 chez les porcins**

Chez le porc, l'ingestion d'aliments contaminés provoque, à faible dose, une hépatotoxicose et, à plus forte dose, un œdème pulmonaire et un hydrothorax.

#### **1.5.2.1 L'ŒDEME PULMONAIRE PORCIN**

Les doses minimales provoquant l'apparition des symptômes de cette maladie ne sont pas connues. Cependant, les signes cliniques sont reproduits chez des porcs ayant ingéré une ration contaminée (175 ppm de fumonisines) sur 4 à 6 jours [49].

Après l'apparition des premiers symptômes, les troubles respiratoires vont en s'aggravant (tachypnée, dyspnée, cyanose des muqueuses) jusqu'à la mort de l'animal en quelques jours.

Les examens biochimiques mettent en évidence une atteinte hépatique. L'autopsie révèle la présence de quelques centaines de ml d'un liquide jaune clair dans la cavité pleurale et un œdème pulmonaire essentiellement interstitiel et interlobulaire.

#### **1.5.2.2 L'HEPATOTOXICOSE**

Moins spécifique que l'œdème pulmonaire, l'hépatotoxicose peut également toucher le porc intoxiqué par les fumonisines.

Contrairement au cheval, les lésions hépatiques surviennent pour de faibles doses :

- pour une dose inférieure à 4 mg/kg PV/j sur 30 jours, les signes cliniques restent absents
- pour une dose comprise entre 4 et 16 mg/kg PV/j, les troubles hépatiques apparaissent
- au-delà, l'affection pulmonaire prend le dessus [19].

Cette toxicose ne se traduit que par des signes généraux (apathie, baisse du GMQ) et un amaigrissement plus ou moins marqué. L'animal peut, dans certains cas, présenter un ictere.

A l'autopsie, le foie, de couleur brune et de taille augmentée, peut comporter des nodules de 1 à 7 mm de diamètre.

### 1.5.3 chez les volailles

Chez les oiseaux, les effets toxiques des fumonisines se traduisent essentiellement par une mortalité embryonnaire et des retards de croissance.

#### 1.5.3.1 TOXICITE POUR L'EMBRYON

Les effets de la toxine, inoculée dans l'œuf, varient avec la dose et le temps. Le tableau IV résume les pourcentage de mortalité en fonction de la dose injectée et du moment de cette injection [34].

L'embryon apparaît plus sensible au début de l'incubation. Les altérations du développement embryonnaire seront les suivantes : disproportion de la tête par rapport au corps (hydrocéphalie), une hypertrophie du bec (pour de faibles doses) et une élongation du cou (pour les œufs inoculés à 1 jour). De plus, si les embryons ne sont pas morts à un stade trop précoce de leur développement, on pourra observer des hémorragies au niveau des pattes, du cou, des membranes de l'œuf et dans le vitellus qui prend alors une consistance visqueuse (jusqu'à donner du coagulum pour les doses les plus importantes).

Les poussins ayant survécu auront du mal à briser leur coquille en raison de la rigidité insuffisante de leur bec. Ils seront également sous-développés et chétifs. Les autres poussins, à l'autopsie, ont un foie jaune et friable, des reins pâles avec des hémorragies focales. Des pétéchies sont présentes sur le myocarde, les poumons sont congestionnés, violacés et fermes. Enfin, les intestins, qui ont une paroi épaissie, présentent une lamina propria et une musculeuse hémorragiques [34].

Dose injectée	Pourcentage de mortalité des embryons	
	Injection au premier jour d'incubation	injection au dixième jour d'incubation
1 $\mu$ M FB1	50	30
10 $\mu$ M FB1	70	60
100 $\mu$ M FB1	100	90
20 $\mu$ M FB1, 4 $\mu$ M FB2	100	80

Tableau IV : Pourcentages de mortalité des embryons en fonction de la dose injectée et du moment d'incubation [34]

### **1.5.3.2 TOXICITE CHEZ LE JEUNE**

L'administration de rations contaminées (100 à 400 mg de FB1 par kg) à de jeunes canards aura pour principale conséquence une diminution de la prise alimentaire, de l'indice de conversion et du GMQ [7]. Pour de fortes doses (300 à 400 mg/kg), on pourra avoir des diarrhées noirâtres, voire une mortalité.

Les canards semblent plus sensibles que les autres volailles à l'action toxique des mycotoxines. A l'autopsie, le poids de certains organes (foie, cœur, reins, pancréas, proventricule) est augmenté. L'examen histopathologique ne révèle pas de lésions majeures, mais le foie peut présenter une nécrose multifocale [24], avec un tissu hépatocellulaire hyperplasié. Pour de fortes doses, on rencontre également une hyperplasie au niveau de l'épithélium bilaire.

Tous les animaux traités auront une peau et des phanères décolorés. Des déformations au niveau des cartilages de l'épiphyse du tarse sont possibles à fortes doses [7].

Chez le poulet, les modifications biochimiques restent classiques avec une augmentation du cholestérol, des GGT, de la LDH, de l'ASAT et de la CK, ainsi que du rapport sphinganine/sphingosine. Par contre, les taux d'acide urique et de triglycérides sont diminués [24].

Des répercussions de l'intoxication sur le système immunitaire existent. En effet, la production des immunoglobulines est affectée, ainsi que l'activité phagocytaire des macrophages qui se trouve réduite de 34% [64]. De par cette action immunodépressive, le risque infectieux vient se surajouter aux troubles liés à la mycotoxicose. [40, 41]

### **1.5.4 chez les autres animaux**

#### **1.5.4.1 LES RUMINANTS**

Les ruminants apparaissent plus résistants que les autres espèces. L'organe cible reste le foie comme le prouve l'exploration biochimique et l'augmentation des marqueurs de souffrance hépatique (GGT, ASAT, LDH), du cholestérol et des triglycérides [59, 23]. Chez les ovins, on trouve, en plus, des concentrations sériques élevées pour l'urée et la créatinine, traduisant une atteinte rénale [23].

L'administration , chez le veau, d'une dose de FB1 égale à 148 mg/kg d'aliment reste sans répercussion sur les performances zootechniques de l'animal. Seule l'histopathologie peut révéler des troubles avec de légères lésions hépatiques microscopiques, ainsi qu'une altération de la lymphoblastogénèse [59].

Les agneaux, pour une dose de 22,2 mg/kg PV sur 4 jours, vont montrer des signes de fatigue, seront léthargiques et auront une diarrhée marquée. Une néphrose tubulaire, associée à l'hépatotoxicose, est mise en évidence à l'autopsie [23].

#### 1.5.4.2 LES RONGEURS

Les effets toxiques des fumonisines sont nombreux chez les rongeurs. Chez le rat, une hépatotoxicité apparaît après l'administration d'une dose de 150 mg/kg de FB1 purifiée. Le métabolisme des sphingolipides est, encore une fois, altéré (augmentation du rapport sphinganine/sphingosine). De la sphinganine libre est détectable au niveau du foie, des reins, du sérum et de l'urine [86].

Le rein constitue également un organe cible chez le rat. En effet, malgré de rares lésions histopathologiques, les signes d'une altération de la fonction rénale sont marqués : polyurie, baisse de l'osmolarité urinaire et une protéinurie trahissant une fuite glomérulaire [78]. Il existe des variations de sensibilité selon le sexe et l'espèce : la souris semble insensible [87], tandis que, chez le rat, le mâle présente des signes cliniques pour des doses moindres par rapport à la femelle (15 mg/kg contre 50 mg/kg) [86].

Les effets sur le système immunitaire se traduisent par une diminution en poids du thymus qui apparaît nécrosé, une augmentation de la concentration sérique en IgM, ainsi que du nombre de cellules phagocytaires [11].

A plus long terme (sur plus de 450 jours), l'ingestion d'aliments contaminés provoque, chez le rat, l'apparition de pathologies cancéreuses. On peut alors observer des carcinomes hépatocellulaires (hyperplasie nodulaire, cirrhose sévère), des cholangiocarcinomes, des adénofibroses ou une hyperplasie des cellules basales de l'épithélium oesophagien ou stomacal [44, 45].

Enfin, bien que la leucoencéphalomalacie semble être une maladie spécifique des équidés, des lésions similaires ont été rapportées sur des lapins ayant reçu de la FB1 purifiée à la dose de 1,75 mg/kg/j [15].

#### 1.5.5 les risques pour l'homme

Pour évaluer la toxicité des fumonisines chez l'homme, de nombreuses études ont été menées sur des singes. Ainsi, l'intoxication de vervets pendant 6 mois par du matériel de culture de *F.moniliforme* provoque l'apparition d'hépatites aiguës ou chroniques (dégénérescence et nécrose, cirrhose). Cette pathologie présente, en outre, une étroite analogie avec l'hépatite virale connue chez l'homme [33].

Un effet cancérigène peut également être suspecté. Il existe dans certaines régions du Transkei (Afrique du sud) et du nord de la Chine [92] une forte prévalence du cancer de

l’œsophage. Celle-ci peut être associée au fait que le maïs constitue, dans ces régions, un aliment de base, et à la contamination importante des cultures par *Fusarium moniliforme* [65, 43].

## 1.6 cinétique et mécanismes d'action des fumonisines

### 1.6.1 la cinétique

Le marquage au C14 de la FB1 permet de suivre le devenir dans l’organisme de la toxine après une administration par voie orale ou parentérale.

#### 1.6.1.1 ABSORPTION

L’absorption orale de la FB1 se révèle très faible chez l’ensemble des animaux. Chez le rat, la quasi totalité de la radioactivité (plus de 80%) est retrouvée dans les fèces 24 heures après une administration intragastrique [55].

Cette FB1 fécale peut avoir 2 origines :

- un passage direct le long du tube digestif sans absorption
- une absorption suivie d’une excrétion biliaire

Dans tous les cas, la mycotoxine ne semble pas être un substrat pour les microorganismes intestinaux [81]. La non absorption intestinale est confirmée par la mesure de la radioactivité de la bile : 24 heures après le gavage des rats avec une solution de FB1 à 75 mg/kg PV, seulement 0,2% de la radioactivité est détectée dans la bile [71].

Chez la poule pondeuse, l’absorption est également faible. Après absorption de 2 mg(47,36 kBq)/kg PV, 0,71+/-0.5% de la radioactivité se retrouve dans la circulation plasmatique. Le pic de concentration est obtenu entre 1 heure 30 et 2 heures 30 avec 28 à 103 ng/ml de FB1 et/ou de ses métabolites associés. Comme chez le rat, la quasi totalité (97+/-3.73%) de la radioactivité se retrouve dans les fèces au bout de 24 heures [88].

#### 1.6.1.2 DISTRIBUTION

##### 1.6.1.2.1 plasmatique

Après l’administration, par voie veineuse, de FB1 marquée chez des poules pondeuses (2 mg FB1/kg PV), l’élimination plasmatique suit une courbe bi-exponentielle ( $t_{1/2\alpha}=2,5+/-0,3\text{mn}$ ,

$t_{1/2\beta}=48,8+/-11,2$  mn). Le volume de distribution apparent est de 18,27 ml/kg et la clairance plasmatique de 1,18 ml/mn/kg [88].

#### 1.6.1.2.2 *tissulaire*

Chez tous les animaux étudiés, le foie et le rein constituent les principales cibles pour l'accumulation de FB1. Chez le rat, des traces de radioactivité y sont encore détectées 96 heures après administration [55].

La distribution tissulaire de FB1 marquée chez des singes vervets (administration par voie orale ou veineuse) est résumée dans le tableau qui suit [72].

Tissu	% de radioactivité mesuré après 24 heures	
	1,72 mg/kg PV par IV	6,42 mg/kg PV par VO
Foie	1,92	0,64
Muscle	0,62	0,14
Rein	0,37	0,03
Cerveau	0,08	0,02
Poumon	0,07	0,03
Cœur	0,04	0,01
Rate	0,02	<0,01
Plasma	0,66	0,12
Hématies	0,11	0,01

Tableau V : Distribution de fumonisine marquée en 24 heures chez des singes vervets [72]

#### 1.6.1.3 METABOLISME

##### 1.6.1.3.1 *in vivo*

L'analyse qualitative des urines ou des fèces montre que la principale forme excrétée est la molécule administrée. La fumonisine peut toutefois subir une hydrolyse partielle (présence de monoesters) [74] ainsi qu'une désamination oxydative [10]. Des traces d'aminopolyols sont aussi détectées. Aucun produit d'hydrolyse n'étant retrouvé dans la bile, on peut penser que la métabolisation a lieu dans le tube digestif, et non au niveau du foie [72], sous l'action des enzymes et/ou des microorganismes intestinaux [73].

#### *1.6.1.3.2 *in vitro**

L'incubation de 600µM de FB1 sur une culture primaire d'hépatocytes de rat ne révèle aucune biotransformation de la mycotoxine. Toutefois, la limite de détection étant comprise entre 50 et 100 ng pour la FB1, des métabolites mineurs sont peut-être passés inaperçus [17].

L'incubation de FB1 avec différentes enzymes microsomaux montre que celle-ci n'est pas un substrat pour les monooxygénase cytochrome P450 dépendantes, ni pour les estérases [17]. Elle n'est pas non plus un substrat pour la lipase pancréatique porcine, ni pour la triglycéride lipase endothéliale hépatique [17].

#### *1.6.1.3.3 effets des fumonisines sur les enzymes de biotransformation*

Si les fumonisines ne subissent que très peu les réactions de biotransformation, elles peuvent en revanche modifier les activités des différentes enzymes impliquées dans ce processus. Ainsi Martinez a mené une étude sur trois groupes de rats auxquels on administrait, par voie intra péritonéale, 0,125 ; 0,25 et 2,5 mg/kg d'extrait de culture de FB1 pendant 6 jours. Les tableaux VI et VII résument les activités enzymatiques hépatiques et rénales [47]. Il a constaté, pour les deux dernières doses, une augmentation des activités rénales et hépatiques de N-déméthylation de l'érythromycine (P450 3A1) et de l'activité hépatique de O-dééthylation de l'éthoxysorufine (P450 1A1). Cette dernière activité est également augmentée dans le rein pour la plus forte dose.

De telles données ne sont pas disponibles en ce qui concerne le canard.

Enzyme	Contrôle	0,125 mg/kg	0,25 mg/kg	2,5 mg/kg
Aniline hydroxylase (1)	0,20±0,01	0,21±0,01	0,28±0,04	0,33±0,03**
Aminopyrine N-déméthylase (1)	0,99±0,067	0,83±0,04	1,27±0,06**	1,33±0,09*
Erythromycine N-déméthylase (1)	122,1±4,8	119,2±8	144,3±3,6**	154,1±12,1*
EROD (2)	43,1±3,0	47,1±4,7	66,2±4,2**	89,4±2,8***
PROD (2)	8,62±0,58	7,44±0,27	9,61±0,78	8,65±1,16
MROD (2)	19,2±1,6	17,6±1,1	18,1±0,9	17,6±1,3

Tableau VI : Activités hépatiques chez des rats traités à la fumonisine B1

Enzyme	Contrôle	0,125 mg/kg	0,25 mg/kg	2,5 mg/kg
Aniline hydroxylase (1)	0,17±0,001	0,17±0,001	0,23±0,01**	0,28±0,02***
Aminopyrine N-déméthylase (1)	0,50±0,03	0,47±0,03	0,61±0,03*	0,66±0,04***
Erythromycine N-déméthylase (1)	89±4	87,2±3,4	117,9±3,4***	131,3±5,3***
EROD (2)	3,68±0,27	3,45±0,19	4,38±0,29	5,04±0,27**
PROD (2)	2,88±0,19	2,94±0,11	3,09±0,25	3,02±0,27
MROD (2)	4,54±0,27	4,39±0,23	4,36±0,32	4,89±0,13

\* : différence significative par rapport à la valeur du lot témoin à p<0,05

(1) : activités en nmol de produit formé/mn/mg de protéine

\*\* : différence significative par rapport à la valeur du lot témoin à p<0,01

(2) : activités en pmol de produit formé/mn/mg de protéine

\*\*\* : différence significative par rapport à la valeur du lot témoin à p<0,001

Tableau VII : Activités rénales chez des rats traités à la fumonisine B1

#### 1.6.1.4 ÉLIMINATION

L'élimination se fait par voie fécale et urinaire dans le cas d'une administration par voie orale. Chez le rat, 80% des marqueurs sont détectés dans les fèces et 3% dans les urines [55].

Par contre, suite à une injection intraveineuse ou intrapéritonéale, la voie d'élimination sera essentiellement biliaire. Ainsi, une dose de 7,5 mg de FB1/kg PV, injectée en IP chez un rat, est retrouvée à 67% dans la bile au bout de 24 heures. 88% de cette dose seront éliminés dans les 4 heures suivantes [71].

## 1.6.2 mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des fumonisines reste inconnu à ce jour. Cependant, on peut noter une étroite ressemblance structurale entre ces toxines et la chaîne carbonée de la sphingosine (Figure 2).

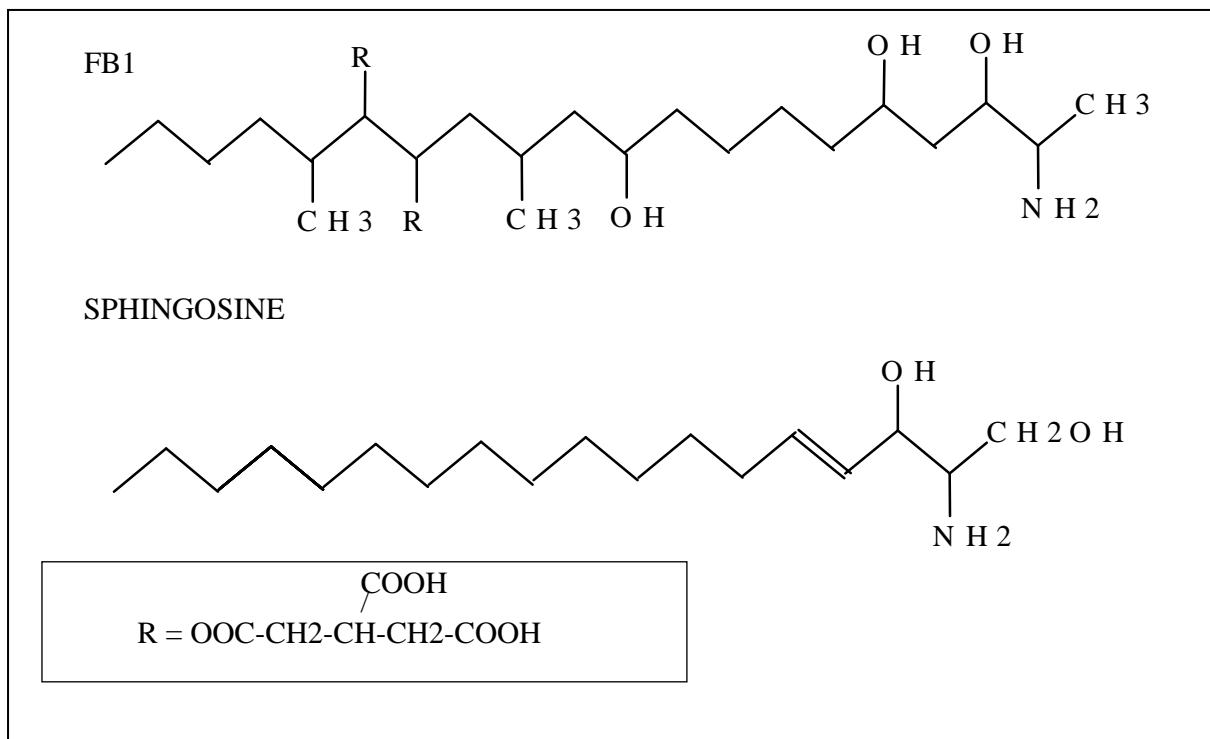


Figure 2 : Comparaison des structures de la FB1 et de la sphingosine

Cette analogie structurale serait à l'origine d'une perturbation de la synthèse des sphingolipides. Nous présenterons, tout d'abord, cette famille de molécules avant d'envisager l'action de la FB1 sur leur synthèse et ses conséquences.

### 1.6.2.1 NATURE ET ROLES DES SPHINGOLIPIDES

Les sphingolipides, qui entrent dans la composition des membranes cellulaires, constituent une famille comprenant plusieurs molécules (céramides, sphingomyélines, gangliosides...). Ces composés sont largement impliqués dans la régulation de la croissance, de la différenciation et de la mort cellulaire. En effet, les chaînes sphingoïdes (sphingosine, céramides) peuvent inhiber ou activer des protéines kinase, des phosphatases, des transporteurs d'ions et autres outils de régulation des activités métaboliques [77].

De par leur rôle de second messager pour les facteurs de croissance, les cytokines et agonistes, les métabolites des sphingolipides peuvent, suite à une augmentation anormale de leur concentration, conduire à des phénomènes pathologiques.

Voyons par quels mécanismes les fumonisines peuvent interférer avec le métabolisme de ces lipides.

#### 1.6.2.2 ACTION DES FUMONISINES SUR LA BIOSYNTHÈSE DES SPHINGOLIPIDES

Ce mécanisme d'action a été essentiellement étudié sur des cultures d'hépatocytes de rat [91], mais des études similaires sur des neurones de souris ont confirmé ces résultats [48].

L'incubation d'hépatocytes de rat avec de la FB1 inhibe l'incorporation de C14-sérine dans les sphingolipides cellulaires par l'intermédiaire de la sphingosine. La concentration inhibant 50% de la synthèse est de 0,1 µM.

L'augmentation de concentration en sphinganine libre suggère que l'action des fumonisines revient à une inhibition de la transformation de cet intermédiaire en N-acyl-sphinganine (Figure 3). Cette hypothèse se trouve vérifiée par l'inhibition par la FB1 de l'activité de la sphinganine N-acyl-transférase (ou céramide synthétase) dans des microsomes hépatiques de rat. Cette inhibition se traduit par une réduction de la conversion de [<sup>3</sup>H]sphingosine en [<sup>3</sup>H] céramides par des hépatocytes pourtant restés intacts [91].

Le mécanisme exact reste obscur. On note cependant une différence d'activité entre les différentes mycotoxines produites par *Fusarium moniliforme* (FB1, FA1 et AP1, un dérivé issu de l'hydrolyse totale de la FB1). Ainsi, il apparaît que l'AP1 est la toxine qui interfère le moins avec la synthèse des sphingolipides, laissant penser que l'acide tricarboxylique joue un rôle majeur dans l'inhibition de la céramide synthétase. Par contre, la présence d'un groupement aminé n'influence en aucun cas l'activité toxique étant donnés les résultats comparables obtenus avec FA1 et FB1 [83].

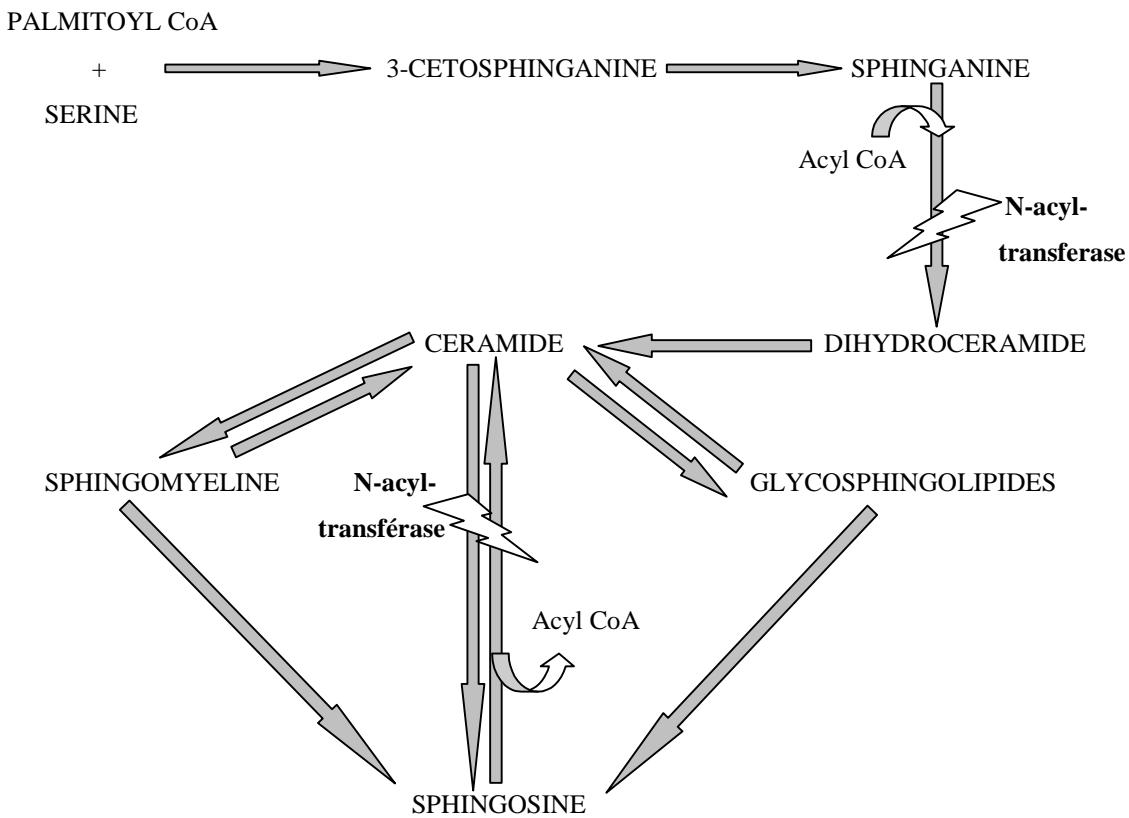


Figure 3 : Voie de biosynthèse des sphingolipides [52]

#### 1.6.2.3 CONSEQUENCES

L'action des fumonisines conduit donc à une accumulation de sphinganine libre et à l'augmentation du rapport sphinganine/sphingosine [84]. Ce rapport pourrait d'ailleurs être utilisé en tant qu'outil diagnostique des mycotoxicoses [16].

Une partie de la sphinganine libre est métabolisée, mais le reste est libéré par les cellules. In vivo, elle s'accumule dans les tissus et se retrouve rapidement dans le sang et les urines [66, 84]. Or, tous les métabolites dérivés des sphingolipides, peuvent se révéler cytotoxiques suivant le type de produit formé, sa localisation intracellulaire et la nature de la cellule [77].

L'accumulation des bases sphingoïdes va donc conduire à une inhibition de la croissance et une accélération du vieillissement cellulaire conduisant au phénomène d'apoptose. Ainsi, sur des hépatocytes de rat, une concentration en FB1 comprise entre 10 et 35 µM conduira, après une période de latence de 24 heures, à une inhibition de la prolifération cellulaire ; une concentration supérieure aboutira toujours à une mort cellulaire. Cependant, il semblerait que ce phénomène d'inhibition soit réversible après le retrait de la mycotoxine [93, 48].

De plus, les fumonisines vont diminuer le rôle de barrière des cellules endothéliales. Ceci peut alors expliquer les signes nerveux et pulmonaires engendrés par les intoxications chez le cheval et le porc.

#### 1.6.2.4 AUTRES MECANISMES

L'étude de l'action des fumonisines sur le muscle atrial de grenouille montre que les courants calciques normalement engendrés par la dépolarisation cellulaire sont bloqués. Il en résulte une réduction de l'amplitude et de la tension maximale du muscle cardiaque. Ceci pourrait expliquer les accidents cardiaques parfois observés suite aux intoxications chez certains animaux [69].

La sphingosine étant un inhibiteur de la protéine kinase C (PKC), la FB1 pourrait également directement altérer l'activité de cette kinase en raison de l'analogie structurale avec les sphingoïdes. Cependant, les effets observés restent variables selon l'isoforme de PKC étudiée [81].

## 2 LES BIOTRANSFORMATIONS

### 2.1 schéma général des biotransformations

Les biotransformations désignent l'ensemble des réactions qu'un xénobiotique peut subir en pénétrant dans un organisme.

Les médicaments et produits chimiques de l'environnement sont pour la plupart non polaires et liposolubles. La principale fonction des enzymes de biotransformation est de convertir ces composés en produits polaires afin de faciliter leur excrétion. Ce processus se divise généralement en deux étapes qui sont la phase I (oxydations, réductions et hydrolyses) et la phase II (conjugaison) [27]. Mais certains xénobiotiques peuvent subir directement des réactions de conjugaison.

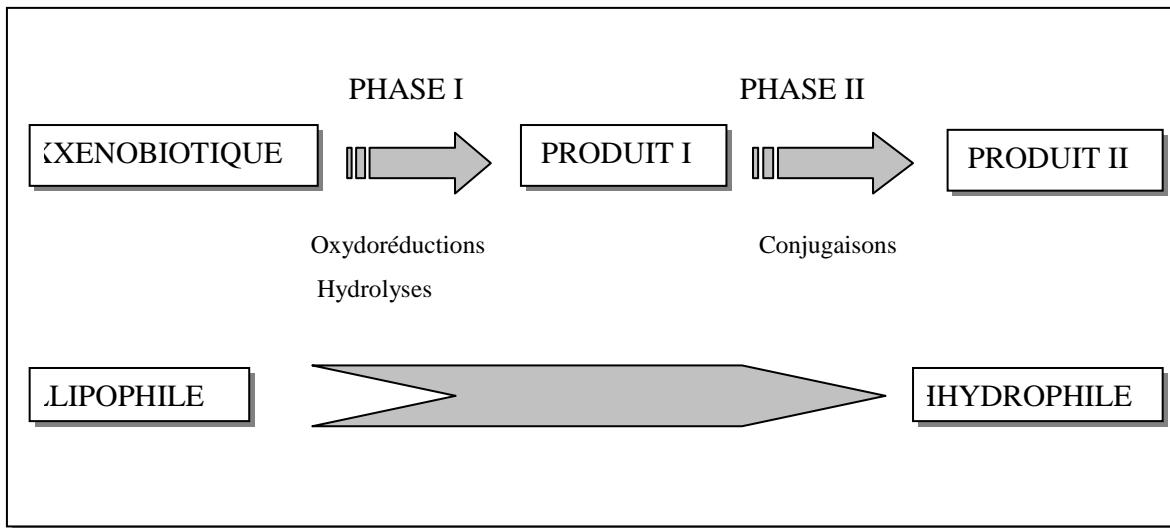


Figure 4 : Schéma général des biotransformations

### 2.1.1 la phase I

Au cours de cette phase, la molécule initiale va subir des dégradations visant à augmenter son hydrosolubilité. Ces réactions de dégradation seront de trois types mais les réactions d'oxydations sont de loin les plus fréquentes. Suivant le substrat à transformer, on pourra avoir des hydroxylations, des époxydations, des désaminations ou des désulfurations oxydatives. Ces réactions sont catalysées par des enzymes membranaires regroupées sous le terme générique de « monooxygénases à fonction mixte » (MFO). Ce système MFO fait intervenir deux types de complexe enzymatique : les monooxygénases à flavines et les cytochrome P450, qui nous intéressent plus particulièrement.

Les deux autres types de réaction, les réductions et les hydrolyses, restent beaucoup moins importantes quantitativement.

### 2.1.2 la phase II

Elle correspond aux réactions de conjugaison entre les métabolites obtenus lors de la phase I et des molécules endogènes, le plus souvent hydrophiles telles que l'acide glucuronique, le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS), le glutathion, ou plus rarement lipophiles tels que les groupements méthyl ou acétyl ou certains acides aminés. On aboutit ainsi à la formation de composés en général plus polaires et donc facilement éliminés par voie rénale ou biliaire [50]. En fonction de l'état d'activation du substrat, les réactions dominantes seront la glucuronoconjugaison, la sulfoconjugaison et l'action des glutathion transférases.

L'ensemble des réactions de biotransformation vont donc, dans la plupart des cas, diminuer l'activité des composés médicamenteux et toxiques et favoriser leur élimination. Néanmoins, ceci

est loin d'être une règle absolue et dans bon nombre de cas, les biotransformations augmentent l'activité ou la toxicité du composé initial.

## 2.2 les monooxygénases à cytochrome P450

Chez les mammifères, c'est dans le foie que la concentration en cytochrome P450 est la plus élevée. Mais on le trouve dans de nombreux autres tissus : au niveau des cellules bronchiolaires, des entérocytes de l'intestin grêle, des tubules proximaux du rein, de l'épithélium olfactif, des testicules, des surrénales, de la peau et du cerveau. Au niveau cellulaire, bien qu'on le trouve aussi dans les mitochondries et les noyaux, le cytochrome P450 est présent principalement dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse [50].

### 2.2.1 l'enzyme

#### 2.2.1.1 STRUCTURE

Le cytochrome P450 est une hémoprotéine de masse molaire comprise entre 48 et 58 kD [35]. Il comporte une partie protéique (apoprotéine) et un hème (protoporphyrine IX) associé à un atome de fer, participant au site catalytique. La présence d'une 5<sup>ème</sup> liaison fer-sulfure avec le groupe thiolate d'une cystéine lui confère une absorption particulière à 450 nm, après réduction et complexation par le monoxyde de carbone, alors que les autres hémoprotéines, comme l'hémoglobine, donnent un maximum d'absorption à 420 nm.

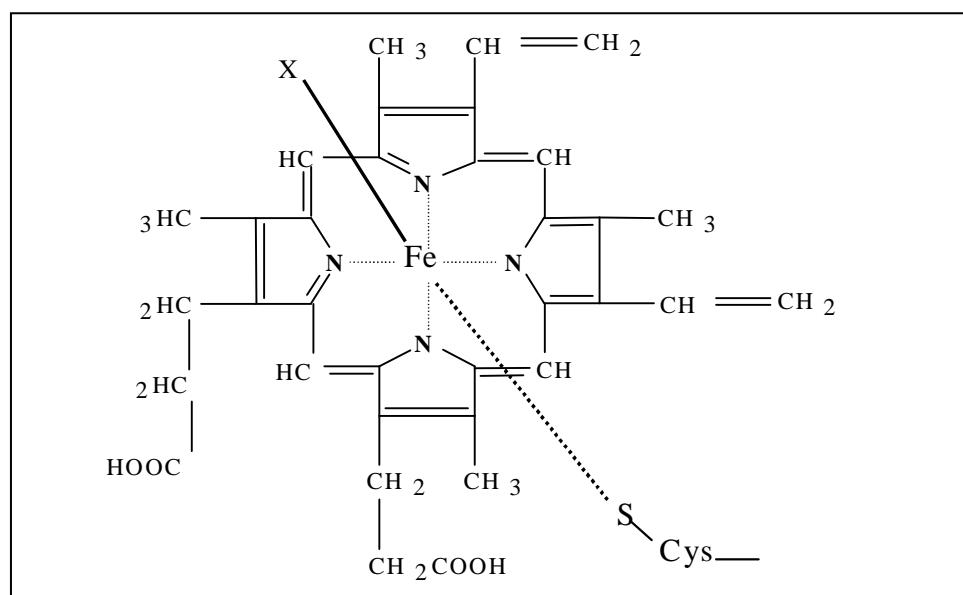


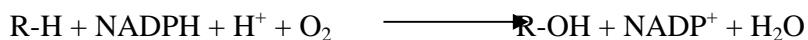
Figure 5 : Structure de l'hémoprotéine du cytochrome P450

Ces cytochromes sont ancrés dans les membranes par un petit segment amino terminal de 29 résidus et leur activité est dépendante d'une flavoprotéine, la NADPH-P450-réductase, dont la fonction est d'assurer le transfert des électrons du NADPH au complexe cytochrome/substrat [51]. La réductase, superficiellement maintenue par un pôle hydrophobe, est orientée comme le P450 vers le cytosol sur ou près de la membrane dans laquelle les sites catalytiques des deux molécules peuvent interagir en acceptant le NADH et les substrats à métaboliser [27].

#### 2.2.1.2 LES PROPRIÉTÉS CATALYTIQUES

Le cytochrome P450 est un puissant agent d'oxydation qui fonctionne essentiellement comme une monooxygénase : incorporation d'un seul atome d'oxygène dans le substrat qui est oxydé en même temps que le NADPH, le deuxième atome d'oxygène participant à la formation d'une molécule d'eau [50].

La réaction globale peut être résumée par la formule suivante :



Le cycle réactionnel du cytochrome P450 se déroule en 6 étapes détaillées dans la figure 6.

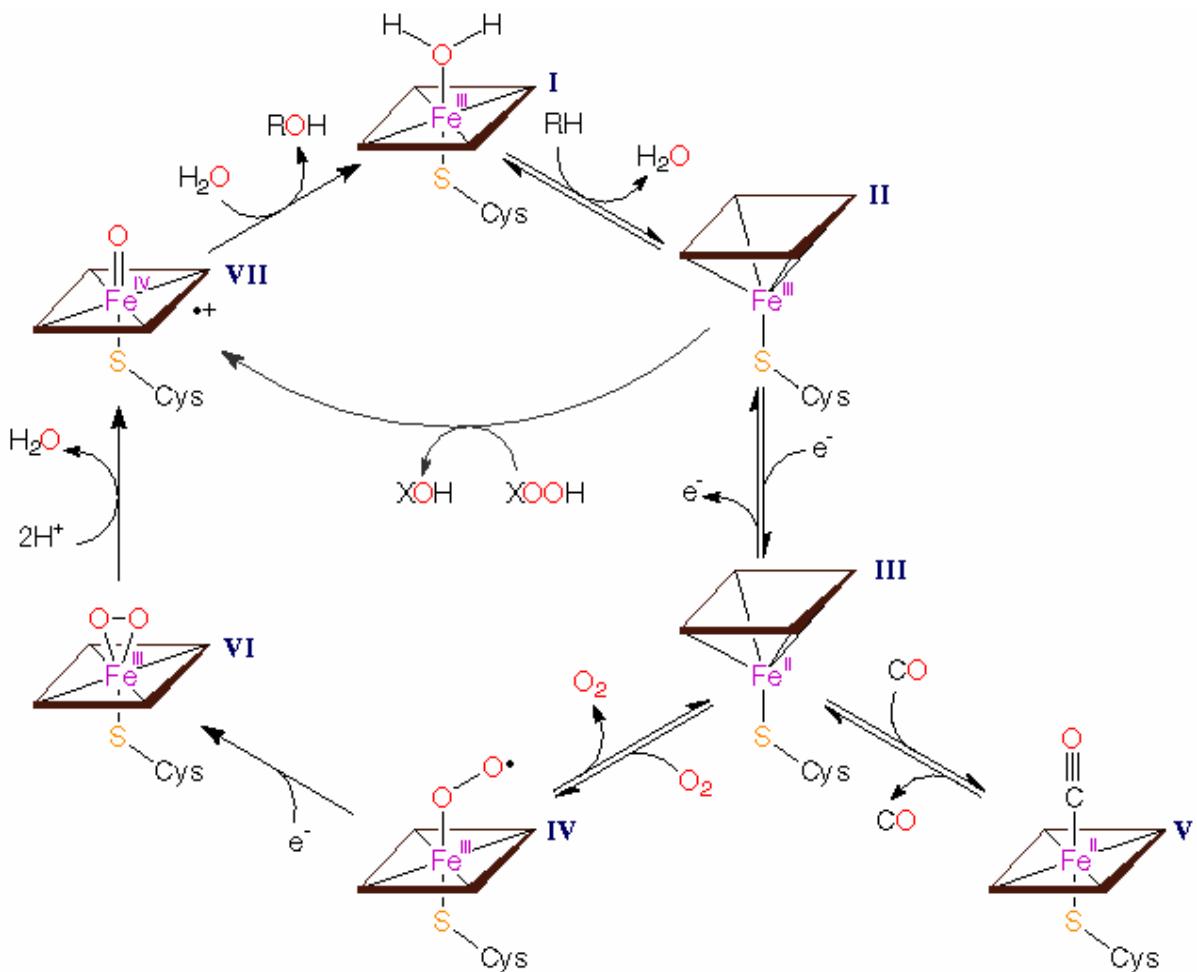


Figure 6 : Cycle catalytique du cytochrome P450

- I. Le substrat RH se fixe sur le site actif du P450. Le fer ferrique passe alors d'un état de spin de niveau bas à un niveau supérieur, le potentiel réducteur s'en trouvant augmenté.
- II. Réduction du complexe enzyme/substrat par un électron fourni par le NADPH ( $\text{Fe}^{\text{III}} \gg \text{Fe}^{\text{II}}$ ).
- III. Fixation de l'oxygène comme 6<sup>ème</sup> ligand sur l'atome de fer hémique.
- IV. Nouvelle réduction par la NADPH cytochrome P450 réductase.
- V. C'est au cours de la phase IV que peut se fixer le CO pour produire le maximum d'absorption à 450 nm.
- VI. Réduction d'un atome d'oxygène en eau.
- VII. Insertion du deuxième atome d'oxygène sur le substrat conduisant à la régénération du cytochrome P450 et à l'oxydation du substrat.

#### **2.2.1.3 LES ISOENZYMES DU CYTOCHROME P450**

Il n'existe pas un seul cytochrome P450 mais une superfamille de cytochromes P450. En effet, la capacité du cytochrome P450 à métaboliser de nombreuses substances est liée à l'existence de plusieurs isoenzymes au sein d'une même espèce. Ces isoenzymes possèdent un site catalytique identique (donc catalysent la même réaction) mais diffèrent par leur partie protéique [50]. La substitution d'un seul acide aminé dans la protéine suffit à modifier l'affinité de l'enzyme pour un substrat donné [35]. Il en résulte l'existence de différents sites de fixation du substrat, expliquant la spécificité de substrat et d'activité pour chaque isotype.

Une comparaison immunologique de différentes enzymes microsomiales montre qu'en dépit d'une étroite ressemblance structurale il n'existe qu'une étroite analogie antigénique [35].

#### **2.2.1.4 LA NOMENCLATURE**

Deux cytochromes P450 seront considérés comme appartenant à la même famille s'ils montrent plus de 40% de similitude dans leur séquence. De même, les sous-familles seront constituées de P450 identiques pour plus de 60% de leur séquence [51].

La nomenclature, mise à jour chaque année, recommande d'indiquer pour le gène le symbole *CYP* (Cyp pour la souris et la drosophile), représentant **Cytochrome P450**, suivi par un chiffre arabe dénotant la famille, par une lettre désignant la sous-famille et par un autre chiffre arabe représentant le gène individuel à l'intérieur de la sous-famille. La nomenclature des gènes humains peut être appliquée à toutes les espèces animales exceptées la souris et la drosophile. Enfin, pour désigner un cytochrome, les mêmes conventions sont utilisées en remplaçant *CYP* par P450 [53].

## 2.2.2 Les facteurs de variation

### 2.2.2.1 *INFLUENCE DU SEXE*

Chez le rat, Waxman (1985) a montré que la femelle présente un déficit de 10 à 30% de la quantité de cytochrome P450 par rapport au mâle. Des études immunochimiques ont, en outre, prouvé l'existence d'isoenzymes spécifiques de chaque sexe. Ainsi le P450 2C11 est spécifique du mâle alors que le P450 2C12 est propre à la femelle [50].

En ce qui concerne les espèces aviaires, les concentrations totales en cytochromes P450 et b5 sont 2 à 4 fois plus élevées chez le coq que chez la poule [60].

### 2.2.2.2 *INFLUENCE DE L'ÂGE*

Les quantités de chaque isotype varient au sein d'une même espèce en fonction de l'âge des individus [50]. Waxman (1985) a étudié différents isotypes chez le rat et a montré que :

- Le P450 2C11 subit une induction à la puberté pour atteindre chez le mâle adulte un niveau 30 fois supérieur à celui du mâle impubère.
- Le P450 2C12, chez la femelle, atteint son niveau maximal à 8 semaines.
- Le P450 2C6 (en quantité égale chez les 2 sexes) subit une nette augmentation entre 2 et 4 semaines (accroissement de 50 à 100%).

### 2.2.2.3 *INFLUENCE DE L'ESPECE : ETUDE DES CYTOCHROMES P450 D'OISEAUX*

Les oiseaux, comme les mammifères, métabolisent les composés exogènes (médicaments, polluants, pesticides) et endogènes (stéroïdes et acides gras) principalement par l'action des cytochromes P450 hépatiques et de la GST. Des enzymes extrahépatiques métabolisant les xénobiotiques sont également retrouvées au niveau des reins et de l'intestin et peuvent participer à cette détoxification [4].

Les concentrations en protéines des microsomes hépatiques sont plus faibles chez les espèces aviaires, notamment chez le canard, comparées à celles trouvées chez le rat (tableau VIII) [20].

Espèce étudiée	Poids relatif du foie (% du PV)	Concentration en protéine des microsomes (mg/g de foie)
Canard	2,01 ± 0,16	15,79 ± 1,73
Rat	4,97 ± 0,17	24,13 ± 1,98

Tableau VIII : Comparaison des concentrations microsomales en protéines chez le canard et le rat [20]

De même, les concentrations en cytochromes P450 sont généralement plus faibles chez les oiseaux comparées aux valeurs des mammifères. On peut citer comme intervalles pour les concentrations en cytochromes P450 de microsomes hépatiques les valeurs suivantes [90] :

- Chez les mammifères (9 espèces étudiées) : entre 0,8 et 1,9 nmol/mg de protéine
- Chez les oiseaux (16 espèces étudiées) : entre 0,15 et 0,51 nmol/mg de protéine
- Chez les volailles (4 espèces étudiées) : entre 0,18 et 0,45 nmol/mg de protéine.

Il faut noter qu'il existe non seulement de grandes variations des enzymes métaboliques entre les oiseaux et les mammifères, mais également entre les différentes espèces d'oiseaux.

Le canard, espèce concernée par notre étude, présente une des plus basses concentrations en P450 parmi l'ensemble des oiseaux étudiés (0,182 ± 0,016 nmol/mg de protéine pour les microsomes hépatiques) [20].

Les données sur la purification et la description des formes inducibles de cytochromes P450 chez les volailles restent vagues. Le tableau IX résume les connaissances concernant le poulet (embryon et adulte) [89].

Nom	Inducteur	Substrats	Commentaires
βNFC	βNF	Benzopyrine	Apparentés au P450 1 A du rat
P450 MC	3MC	Aminopyrine, aniline	
P448 L	PCB	EROD	Assimilés au βNFC
βNFB	βNF	Benzopyrine, aminopyrine	Assimilé au P448
P448 H	PCB	Aniline, oestradiol	Assimilé au βNFB
P450 2H1	PB	Benzphétamine	Apparentés aux P450 2B1 et 2B2 du rat
P450 2H2	PB	Benzphétamine	
PB-A	PB		
PB-B	PB		
2E	Acétone, éthanol	p.nitrophénol	Apparenté au P450 2E du rat

Tableau IX : Formes inducibles de cytochrome P450 chez le poulet

Il existe deux formes principales,  $\beta$ NFB et  $\beta$ NFC, pouvant être assimilées à la famille 1A des cytochromes de mammifères. D'autres formes (P450 MC, P448 L et P448) présentant de nombreuses analogies peuvent être rattachées à ce groupe. Les P450 2H1 et 2H2 sont, quant à eux, similaires aux formes 2B1 et 2B2 du rat. Enfin, une forme inductible à l'acétone a été comparée à la famille des P450 2E des rongeurs.

## 2.3 Les enzymes de conjugaison de la phase II

### 2.3.1 Les UDP glucuronyl transférases

La glucuronidation est une des principales réactions de conjugaison permettant de convertir les xénobiotiques ainsi que de nombreux composés endogènes en métabolites polaires et hydrosolubles.

La principale enzyme de cette conjugaison est l'UDP glucuronyl transférase qui est présente dans la bicouche phospholipidique du réticulum endoplasmique. Cette transférase catalyse la translocation de l'acide glucuronique depuis l'acide UDP- $\alpha$ -D-glucuronique sur un composé approprié pour former le  $\beta$ -D-glucuronide.

Cette enzyme est présente chez tous les mammifères, oiseaux et reptiles étudiés. Son activité se situe principalement au niveau hépatique, mais elle est également détectée dans les reins, le tractus digestif et la peau [36].

On distingue deux sortes d'UDP glucuronyl transférase dans les microsomes [35] :

- Le type A, majoritaire à la fin de la période fœtale, conjuguant essentiellement les phénols.
- Le type B, majoritaire dans la période néonatale, conjuguant les stéroïdes et la morphine.

### 2.3.2 Les Glutathion S-Transférases

Les Glutathion S-Transférases, protéines cytosoliques dimériques (25 kDa par monomère), constituent une famille d'enzymes polyvalentes impliquées dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques et composés activés endogènes (stéroïdes, prostaglandines et leucotriènes) [63].

Comme pour les P450, les GST forment une super-famille composée de près de 100 séquences différentes [76]. Chez les mammifères, la nomenclature distingue plusieurs classes de gènes nommés Alpha, Pi, Mu, Sigma et Theta [63]. Par contre, chez les autres animaux, aucune nomenclature n'est proposée à l'heure actuelle.

L'activité des GST prise en compte dans cette étude sera la catalyse de l'attaque nucléophile du groupe thiolate du glutathion, tripeptide constitué de l'acide glutamique, de

cystéine et de glycine, sur le centre électrophile d'un substrat (qui peut avoir subi une activation préalable lors de réactions de phase I)

Mais, en plus de cette fonction enzymatique, le GST peut également lier de nombreux composés qui ne seront pas métabolisés, comme la bilirubine, les acides biliaires ou des agents carcinogènes [12].

Encore une fois, cette enzyme sera essentiellement présente au niveau hépatique. En effet, la meilleure activité de conjugaison du 1-chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB), chez le rat, est trouvée dans le foie, suivi des testicules et du rein [12].

## 2.4 Les facteurs de modification des activités enzymatiques

Les facteurs susceptibles de moduler les activités enzymatiques sont nombreux, ce qui n'est pas surprenant dans la mesure où l'on a affaire à un système hautement adaptatif. Ces facteurs peuvent être exogènes (apports alimentaires, stress, toxique) ou endogènes (espèce, souche, âge, sexe).

### 2.4.1 Facteurs endogènes

#### 2.4.1.1 *INFLUENCE DU SEXE*

Le métabolisme du mâle est, en général, plus important que celui de la femelle. Ceci est bien connu pour l'activité du P450 2C11 du mâle qui est bien plus importante que celle du P450 2C12 de la femelle [50].

Chez les volailles, le métabolisme des xénobiotiques (hexobarbital, coumarine et éthoxresorufine) et des stéroïdes est 2 à 4 fois supérieur chez le coq par rapport à la poule [60]. Par contre, une étude menée chez le canard mulard conclue que l'activité des monooxygénases n'est pas liée au sexe [67].

#### 2.4.1.2 *INFLUENCE DE L'ESPECE*

La plupart des espèces d'oiseaux montre des activités enzymatiques inférieures à celles des mammifères d'un poids comparable. De plus, il existe une forte corrélation entre cette activité et le régime alimentaire. En effet, les oiseaux piscivores, ainsi que certains prédateurs spécialisés, présentent des activités métaboliques bien inférieures à celles des mammifères ou des oiseaux omnivores [89].

Les tableaux X et XI donnent quelques valeurs d'activités pour les enzymes hépatiques. On peut constater d'importantes différences entre espèces, les canards ayant le plus souvent de faibles capacités métaboliques.

Espèce	Nombre d'animaux	Concentration en P450 total (1)	Benzphétamine N déméthylase (2)	aniline hydroxylase (3)
Caille	9	0,163 ± 0,021	1,86 ± 0,20	0,101 ± 0,006
Canard	10	0,182 ± 0,016	1,78 ± 0,27	0,125 ± 0,015
Oie	8	0,286 ± 0,041	4,07 ± 0,68	0,248 ± 0,021
Poulet	9	0,257 ± 0,011	2,22 ± 0,17	0,254 ± 0,029
Dinde	12	0,363 ± 0,030	3,33 ± 0,26	0,262 ± 0,024
Rat	10	0,535 ± 0,029	1,90 ± 0,15	0,199 ± 0,016

(1) En nmol/mg de protéine

(2) En nmoles de formaldéhyde formé/mn/mg de protéine

(3) En nmoles de *p*.aminophénol formé/mn/mg de protéine

Espèce	<i>p</i> .nitroanisole O-déméthylase (4)	procaïne estérase(5)	<i>p</i> .nitrophénol O-glucuronyl transférase(6)	sulfaméthazine N-acétyl transférase (7)
Poulet	23,87 ± 7,56	4,69 ± 2,67	1,65 ± 1,01	0,0059 ± 0,0028
Canard	7,63 ± 3,61	1,66 ± 1,45	2,55 ± 1,36	0,0038 ± 0,0020
Dinde	17,56 ± 9,54	6,59 ± 4,03	1,54 ± 2,65	0,0056 ± 0,0135
Rat	13,91 ± 2,84	2,38 ± 1,60	2,61 ± 1,26	0,0258 ± 0,0064
Lapin	23,60 ± 5,18	4,37 ± 2,33	6,36 ± 0,80	0,3040 ± 0,0702

(4) En nmoles de *p*.nitrophénol formé/mn/g de foie

(5) En nmoles d'ester de procaïne formé/mn/g de foie

(6) En nmoles de glucurono-*p*-nitrophénol formé/mn/g de foie

(7) En nmoles de sulfaméthazine acétylée/mn/g de foie

Tableaux X et XI : Activités enzymatiques chez différentes espèces [20, 75]

## 2.4.2 facteurs exogènes

### 2.4.2.1 L'INDUCTION

#### 2.4.2.1.1 généralités

L'induction revient à une augmentation des activités de biotransformation suite à l'action de composés endogènes ou exogènes. Ce phénomène concerne non seulement les enzymes de phase I et II du foie, mais également de nombreux tissus extrahépatiques (notamment avec des inducteurs du type du 3-Méthylcholanthrène (3MC)).

Tous les cytochrome P450 ne sont pas inductibles et, dans une même famille, tous les cytochromes ne sont pas induits de manière égale : dans la famille 2 des P450 seulement 3 sous-familles sont inductibles, deux (2B et 2C) par le phénobarbital (PB) et une (2E) par l'éthanol.

Beaucoup d'inducteurs sont des substrats pour les formes de P450 qu'ils induisent. Ils augmentent donc leur propre métabolisme. Ainsi, un médicament peut induire sa propre biotransformation et par conséquent réduire sa propre efficacité, par augmentation de la clairance, en plus de celle d'autres agents. Par exemple, la rifampicine est un inducteur du cytochrome P450 3A4 dans le foie et l'intestin. Lors de l'administration concomitante de contraceptifs oraux, le métabolisme de ces composés sera augmenté, conduisant à une absence d'activité.

La plupart des composés qui induisent des P450 induisent également des enzymes de conjugaison de la phase II. Chez le rat, les UDP-glucuronyl transférases sont induites par le PB (augmentation de l'activité de 160 à 220%) et le 3MC (augmentation de 220 à 330%) [36, 35]. Les GST seront également induites (augmentation de 171 à 209% de l'activité par le PB et de 150 à 220% par le 3MC).

Le tableau suivant donne pour chaque sous-famille les inducteurs spécifiques connus [51, 57].

P450 : famille et sous-famille	Substrats spécifiques	Inducteurs spécifiques
1A	Benzopyrène, Etoxy résorufine (1A1)	3MC, βNF
	Acétanilide, Méthoxy résorufine (1A2)	
2A	Testostérone	3MC, βNF, PB (2A2 non inducible)
2B	Benzphétamine (2B1, 2B4), Pentoxy résorufine (2B1)	PB
2C	Aminopyrine (2C3)	PB
	Progestérone (2C5)	
	Benzphétamine (2C8, 2C11)	
2D	Débrissoquine	(non inducible)
2E	Aniline, N nitroso diméthylamine (2E1)	Ethanol, acétone, ether
3A	Erythromycine (3A1, A3, A4, A7), Ethylmorphine	PB, dexaméthasone, rifampicine
4A	Acide laurique-11 (4A1, 4A7)	Clofibrate
	Prostaglandines (4A4)	Progestérone

Tableau XII : Inducteurs spécifiques des différentes isoenzymes de P450

#### 2.4.2.1.2 les mécanismes de l'induction

L'induction revient à une augmentation du taux de protéine dans la cellule. Cette élévation de concentration est essentiellement due à une augmentation de la transcription du gène codant pour le P450 induit. Mais il existe également des mécanismes non transcriptionnels pour induire les cytochromes (stabilisation de l'ARN<sub>m</sub> ou de la protéine) [57].

Il existe principalement quatre « familles » d'inducteurs :

- Type 3 MC : Le mécanisme est essentiellement étudié pour la famille 1A1. La transcription du gène *CYP1A1* est activée par des composés qui agissent en se fixant au récepteur ah (aromatic hydrocarbon) et en le convertissant en une forme capable d'interagir avec un petit segment d'ADN localisé en amont du gène codant le cytochrome [29].
- Type PB : De nombreuses formes de cytochromes P450 (familles 2B, 2C, 3A) sont induites par ce composé [29]. Le mécanisme d'induction reste comparable à celui du

3MC sauf que le moyen de reconnaissance de l'inducteur par la cellule et son moyen d'action sur la transcription restent inconnus. L'existence d'un récepteur pour les inducteurs de ce type a été envisagée mais reste peu probable vue la grande variabilité structurale des composés appartenant à cette catégorie [57].

- Type pregnénolone-16- $\alpha$ -carbonitrile (PCN) et glucocorticoïdes : Ce sont des inducteurs pour le cytochrome P450 3A1 qui peut être également induit par des agents antifongiques (imidazoles), des antibiotiques macrolides (rifampicine, érythromycine) ou par le PB et apparentés. Suivant l'inducteur en cause, les phénomènes transcriptionnels ou de stabilisation de la protéine et/ou de ses messagers seront plus ou moins importants [57].
- Type éthanol : Cette induction concerne la famille 2E1. Elle semble être la conséquence de la stabilisation de la protéine et de l'ARN<sub>m</sub> correspondant, et non de l'augmentation de la transcription du gène codant [57].

#### 2.4.2.1.3 *l'induction chez les oiseaux*

- Induction par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), les polychlorobiphényles (PCB) planaires et les naphtalènes polychlorés : ces inducteurs sont caractérisés par leur action sur l'EROD. Le type de réponse obtenu rappelle celui de l'induction des P450 de la sous-famille 1A chez les mammifères. Il existe cependant quelques variations suggérant que les formes aviaires induites diffèrent de celles des mammifères [89].
- Induction par le PB et les PCB non-planaires : Ils sont responsables de l'induction des P450 de la sous-famille 2B chez les mammifères, ce qui correspond aux cytochromes P450 2H1 et 2H2 des volailles. On note, chez les oiseaux, quelques différences de réponse à ces inducteurs par rapport au rat. Par exemple, l'activité de l'EROD est augmentée par le PB chez le canard mulard alors que cette induction n'est pas décrite chez les rongeurs.
- Induction par les fongicides inhibiteurs de la biosynthèse d'ergosterol (EBI) : Chez les mammifères ce sont à la fois des inducteurs et des inhibiteurs de certaines formes de P450. Chez les oiseaux, ces composés peuvent avoir une action en 2 temps : d'abord une rapide inhibition de certaines monooxygénases suivie, au bout d'une douzaine d'heures, d'une importante induction de cytochromes P450 hépatiques. Les enzymes induites par les EBI se révèlent être immunoréactives vis-à-vis d'anticorps dirigés contre les P450 des familles 1, 2, 3 et 4 des mammifères. Chez la caille, les EBI testés induisent entre autre l'EROD, la PROD et la MROD.

#### **2.4.2.2 L'INHIBITION**

Le phénomène d'inhibition correspond à une diminution de l'activité d'une enzyme ou d'un système enzymatique du fait de l'action d'un composé exogène ou endogène [80].

Trois grands groupes d'inhibiteurs de cytochromes P450 peuvent être différenciés en fonction de leur cible, ceux qui agissent par [51] :

- la liaison au substrat
- la liaison de la molécule d'oxygène (suite au premier transfert d'électron)
- l'oxydation du substrat.

Suivant le mécanisme mis en jeu, l'inhibition sera ou non réversible.

##### **2.4.2.2.1 les inhibitions réversibles**

Les inhibitions réversibles ne sont que transitoires et les enzymes peuvent retrouver leurs fonctions normales après l'élimination du composé compétiteur.

- Par coordination du fer ferrique, avec diminution de l'état de spin. Le potentiel réducteur de l'enzyme est alors fortement diminué et le pic d'absorption est amené à 430 nm. Ce mécanisme est, par exemple, mis en jeu lors de l'action du cyanure [51].
- Par coordination du fer ferreux, comme c'est le cas avec le monoxyde de carbone responsable du pic d'absorption à 450 nm.
- Par liaison lipophile au site actif et coordination de l'hème : Les alcools, l'éther, les cétones et les lactones peuvent engager un atome d'oxygène dans une liaison de coordination de l'hème. Ils se révèlent être de faibles inhibiteurs. Par contre, des composés comme la pyridine ou les imidazoles, avec une forte liaison de coordination, sont des inhibiteurs plus actifs. L'inhibition résultera d'un phénomène de compétition sur le site actif du cytochrome lors de la première étape du cycle [51].

##### **2.4.2.2.2 les inhibitions par formation d'un complexe avec des métabolites activés (MI)**

De nombreux composés exogènes et médicaments, qui ne sont pas des substances inhibitrices à l'origine, peuvent le devenir après avoir été convertis et activés par les P450. Ce mécanisme concerne, par exemple, certaines hydrazines et plusieurs dérivés alkylamine [51]. Après formation, le complexe P450/MI reste relativement stable, une réactivation étant toutefois possible.

#### 2.4.2.2.3 les inhibitions nécessitant une catalyse

Il s'agit d'inhibitions irréversibles faisant intervenir la formation de liaisons covalentes avec l'enzyme.

- Par liaison covalente à l'hème: ce mécanisme concerne les acétylènes, les cyclopropylamines et les dihydropyridines dont les métabolites formés avec le cytochrome vont inactiver ce dernier par une N-alkylation de l'hème [51].
- Par liaison covalente à l'apoprotéine: c'est le cas pour des composés sulfurés (disulfate de carbone, parathion, malathion, diéthyldithiocarbamates...) ou halogénés (principalement le chloramphénicol) [82, 51]. Elle est accompagnée d'une modification de structure voire d'une destruction de la protéine.

Enfin, de nombreux ions métalliques interfèrent avec la synthèse des P450 (cobalt, cadmium, manganèse, nickel) [80, 82].

Le tableau suivant donne pour quelques sous-familles de cytochrome P450 les différents composés inhibiteurs ainsi que les mécanismes mis en cause [51].

Sous-famille de P450	Inhibiteurs	Mécanismes
1A1	$\alpha$ -Naphtoflavone	Réversible
2B1	Secobarbital, $\alpha,\alpha$ -Dichlorotoluène	Alkylation (hème/protéine)
	Diphénhydramine, Orphénadrine	Complexation MI
2B4	1-N-Benzylamino-benzotriazole	Inactivation
2C5, 2C6	17 $\beta$ -Vinyl- et 17 $\beta$ -Ethynylandrost-4-ène-3-one-22-amino-23,24-bisnor-5cholen-3 $\beta$ -ol	Inactivation Réversible
2D	Ajamalicine	Reversible
2E1	Diallyl sulfate	Alkylation (protéine)
3A1	Erythromycine	Complexation MI
3A4	17 $\alpha$ -Ethynyoestradiol	Inactivation

Tableau XIII : Inhibiteurs de cytochromes P450 et leurs mécanismes d'action [51]



# **DEUXIEME PARTIE :**

# **MATERIEL ET METHODES**



### 3 REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES

#### 3.1 appareillage

Pour le dosage des activités N-déméthylases et pour celui des protéines nous avons utilisé un spectrophotomètre UVIKON 922 (KONTRON Instruments S.A.).

La séparation des fractions cellulaires pour la préparation des microsomes a été réalisée à l'aide d'une ultracentrifugeuse TGA-65 (KONTRON Instruments S.A.).

Le dosage des activité O-déalkylases a été réalisé au fluorimètre 8465 (Bischoff).

#### 3.2 réactifs

Le réactif permettant le dosage des protéines provient de Bio Rad, Paris, France.

L'Ethylmorphine nous a été fournie par la Coopération Pharmaceutique Française, Melun

##### Réactifs provenant de Sigma, Saint-Louis, M.O., USA

NADPH , Acétylacétone, Acide trichloroacétique, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Erythromycine, Aminopyrine, N-nitrosodiméthylamine, ZnSO<sub>4</sub>, 1 chloro 2-4 dinitrobenzène (CDNB), TRIS acétate, Butylated hydroxytoluène (HTB ou BHT), Dithionite de sodium.

##### Réactifs provenant de Merck, Darmstadt, Allemagne

Acétate d' ammonium, TRIS, HCl, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Chlorure de potassium(KCl), NaCl, KCl.

##### Réactifs provenant de Prolabo, Paris, France

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Formaldéhyde, Baryte de sodium, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

##### Réactifs provenant de Fluka, Suisse

EROD, MROD, PROD, Résorufine, 1-2 dichloro 4 nitrobenzène (DCNB).

#### 3.3 culture des fumonisines

La souche de *F.moniliforme* utilisée dans cette étude a été isolée à partir de maïs impliqué dans des cas d'ELEM décrits en Tunisie.

Sa culture sur du riz (pendant 5 semaines, à 20°C et à l'obscurité) a été suivie d'une extraction à l'aide d'un mélange acetonitrile/eau (3:1) et d'une concentration par évaporation.

Les concentrations en fumonisine du matériel de culture ont été déterminées par chromatographie sur couche mince. Enfin, les volumes ont été ajustés avec de l'eau afin d'obtenir trois concentrations (0,4 ;1,2 et 3,6 mg FB1/ml).

## 4 TRAITEMENT DES ANIMAUX

On utilise 20 canards de barbarie agés de 6 semaines, pesant initialement 1,5 kg ( $\pm 0,2$ ). Ils reçoivent *ad libitum* de l'eau et de la nourriture.

Ces canards sont divisés par randomisation en 4 lots de 5 animaux (1 lot témoin et 3 lots traités).

L'administration des fumonisines se fait quotidiennement par gavage avec 12,5 ml de matériel de culture (tableau XIV).

Lot de canards	dose de traitement (mg/kg de PV)
numéros 01 à 05	0
numéros 11 à 15	5
numéros 21 à 25	15
numéros 31 à 35	45

Tableau XIV : Doses de traitement des 4 lots d'animaux.

Le traitement dure 12 jours, l'euthanasie étant pratiquée le 13<sup>ème</sup> jour. Les foies et les reins sont alors prélevés et conservés à – 80°C.

## 5 PREPARATION DES FRACTIONS CELLULAIRES

Les cytosols et microsomes (réticulum endoplasmique) hépatiques et rénaux sont obtenus par ultracentrifugation selon le protocole suivant [26]:

- 10 g de foie sont homogénéisés au potter type Braun Helsingue dans du tampon 1 à +4°C à l'aide d'un piston en téflon (1300 t/mn pendant 5 mn ).
- l'homogénat est filtré sur gaze et ajusté à 22 ml avec ce même tampon 1 puis centrifugé à 9000 g à 4 °C dans une ultracentrifugeuse pendant 30 mn.
- le culot, formé de noyaux, de mitochondries, de cellules entières, est éliminé alors que le surnageant est centrifugé à 10500 g pendant 1 h.
- le surnageant obtenu correspond au cytosol dont on mesure le volume que l'on réparti en fractions aliquotes conservées à – 80 °C.

- le culot formé par les microsomes est repris avec du tampon 2, repottérisé, puis centrifugé à 10500 g pendant 30 mn.
- le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 8 ml de tampon 3. Cette suspension microsomale est répartie en aliquotes de 1 ml qui sont conservées à 80°C jusqu'à leur analyse.

Les différentes solutions utilisées sont :

- tampon K (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0.1 M, pH 7,4 : 206 ml;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 0.1M , pH 7,4 : 794 ml ; pH de 7,4 ajusté si nécessaire )
- tampon 1 (tris-acétate: 18,10 g; KCL 7,45 g; EDTA : 0,34 mg; Hydroxytoluène : 4,00 mg ; tampon K : QSP 1000,00 ml)
- tampon 2 ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  : 22,30 g; ED : 350,00 ml, dilution à 40 °C, le pH de 7,5 est ajusté par l'ajout de HCl (1 N ) : 35,00 ml, ED : QSP 500,00 ml)
- tampon 3 ( EDTA : 16,80 mg, Glycérol : 100 ml, tampon K : QSP 500,00 ml)

## 6 DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines a été réalisé à l'aide d'un kit biorad, la solution étalon étant une solution mère de BSA (Serum Albumine Bovine) à 2mg/ml.

- Après avoir introduit une certaine quantité d'échantillon dilué au 1000<sup>ème</sup>, on ajuste le volume à 800 µl avec de l'eau distillée.
- On rajoute ensuite 200 µl de réactif, puis on incube les tubes à l'abri de la lumière pendant 20 min.
- La densité optique (DO) est ensuite mesurée à 595 nm.

Un exemple type de gamme d'étalonnage est donné dans la figure suivante.

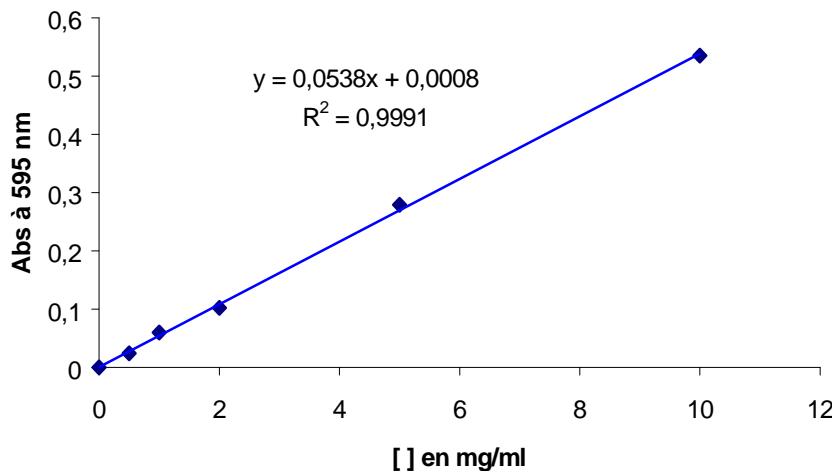


Figure 7 : exemple type de gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines.

## 7 DOSAGE DES CYTOCHROMES B5 ET P450

Les dosages des cytochromes b5 et P450 sont effectués selon la méthode de Omura et Sato [58] basée sur les différences spectrales entre les échantillons, réduits par le dithionite de sodium pour le b5, puis complexés par le monoxyde de carbone pour le P450.

- 2 à 4 mg de protéines sont dilués sous un volume de 2 ml avec du tampon phosphate 0,1 M et pH 7,4 puis répartis dans 2 cuves en quartz.
- La ligne de base est mesurée entre 390 et 490 nm.
- On ajoute dans la cuve de dosage une faible quantité de dithionite de sodium, puis on refait défiler le spectre de longueur d'onde 390-490 nm. Le pic observé à 420 nm est celui du cytochrome b5.
- Du dithionite de sodium est alors ajouté dans la cuve de référence, et on fait barboter du monoxyde d'azote pendant 30 s dans la cuve de dosage. On refait défiler le spectre, toujours dans la même gamme de longueur d'onde. Le pic observé à 450 nm est celui du cytochrome P450.

Un exemple de spectres d'absorption obtenus est donné dans la figure 8.

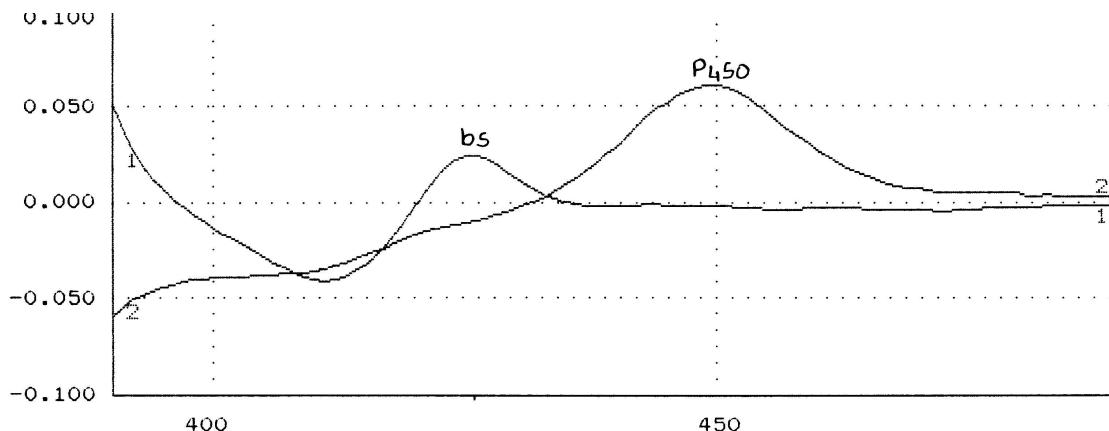


Figure 8 : Spectres d'absorption des cytochromes b5 et P450 chez le rat.

Les concentrations en cytochromes sont calculées à l'aide des équations suivantes :

$$[ \text{b5} ] = \frac{\Delta \text{DO} * 1000}{171 * [ \text{mg prot/ml} ]}$$

$$[ \text{P450} ] = \frac{\Delta \text{DO} * 1000}{91 * [ \text{mg prot/ml} ]}$$

où 171 et 91 sont les coefficients d' extinction molaires respectifs du b5 et du P450.

## 8 DOSAGES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

### 8.1 Détermination de la température d'incubation

Les méthodes de dosage employées sont celles utilisées chez les mammifères. Etant donné le métabolisme particulier des oiseaux et le manque de données bibliographiques, il nous a fallu déterminer la température d'incubation permettant d'atteindre une activité enzymatique optimale.

Les dosages sont réalisés sur un pool des doses témoins à diverses températures (38, 40 et 42°C). Les substrats utilisés sont l'aminopyrine et l'érythromycine pour les N-déméthylases, et la méthoxy résorufine pour les O-déalkylases.

Les différentes activités sont rapportées dans le tableau XV.

Température d'incubation (°C)	Substrat	Activité enzymatique
38	Aminopyrine	<b>0,19 *</b>
	Erythromycine	0,0429 *
	Méthoxy résorufine	<b>1,35 **</b>
40	Aminopyrine	0,16 *
	Erythromycine	0,0851 *
	Méthoxy résorufine	1,23 **
42	Aminopyrine	0,15 *
	Erythromycine	<b>0,1195 *</b>
	Méthoxy résorufine	0,94 **

\* : en mmol de formaldéhyde formé/mn/mg de protéine

\*\* : en nmol de résorufine formée/mn/mg de protéine

Tableau XV : Influence de la température d'incubation sur les activités enzymatiques

On a une activité maximale à 38°C pour l'aminopyrine et la méthoxy résorufine et à 42°C pour l'érythromycine. Dans un souci d'homogénéité, on choisit d'effectuer tous les dosages à la même température. Les incubations se feront donc à 40°C.

## 8.2 Activité des N-déméthylases

Le principe de ces dosages est de mesurer au spectrophotomètre la production de formaldéhyde (méthode de Nash modifiée par Cochin et Axelrod [18]) à partir des différents substrats testés (aminopyrine, érythromycine, éthylmorphine, benzphétamine, N-nitrosodiméthylamine) afin de rendre compte de l'activité des N-déméthylases.

- On introduit dans des tubes eppendorf de 2 ml, 1 mg de protéine microsomale hépatique ou 2 mg de protéines microsomaies rénales, 50 µl de substrat (Aminopyrine 20 mM, Benzphétamine 20 mM, Erythromycine 20 mM, Ethylmorphine 20 mM et N Nitroso diméthylamine 100 mM), 20 µl de NADPH à 40 mM et du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 qsp 1 ml.
- Parallèlement, pour chaque échantillon, un blanc « réactif » de même composition que l'essai, mais sans substrat, est préparé.
- On incube ensuite 20 min à 40°C.
- La réaction enzymatique est stoppée par ajout de TCA à 25 % (500µl) faisant précipiter les protéines, puis on centrifuge 5 min à 10000 g. On collecte enfin 1 ml de

surnageant et on ajoute dans la gamme, les essais et les blancs, 500 µl de réactif de Nash afin de révéler l'éventuelle présence de formaldéhyde.

- La lecture de la DO se fait à 412 nm après une incubation de 30 minutes à 60°C.
- Une gamme de dosage est réalisée dans les mêmes conditions avec du formaldéhyde à 38 ng/ml. Un exemple des résultats obtenus est donné dans la figure 9.

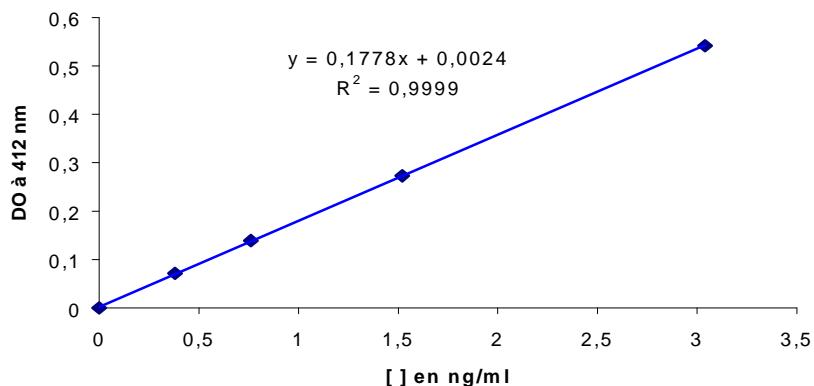


Figure 9: gamme d'étalonnage des activités N-déméthylases

L'activité enzymatique est déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$A = \frac{x * d * 1000}{30 * t * q}$$

avec : A : activité en mmol/min/mg de protéines

x : ng/ml de formol (d'après la gamme)

d : la dilution

30 : poids moléculaire du formaldéhyde en g/mol

t : durée d'incubation en minutes

q : concentration des protéines de l'échantillon en mg/ml

Les oiseaux ayant un métabolisme relativement différent de celui des mammifères, il nous a fallu déterminer les concentrations en substrat nécessaires pour une activité enzymatique optimale. Des dosages ont donc été réalisés sur un pool des doses témoins pour diverses concentrations en substrat. Les résultats donnés dans les figures 10 et 11 montrent que la concentration optimale est de 20 mM pour ces réactions de N-déméthylation..

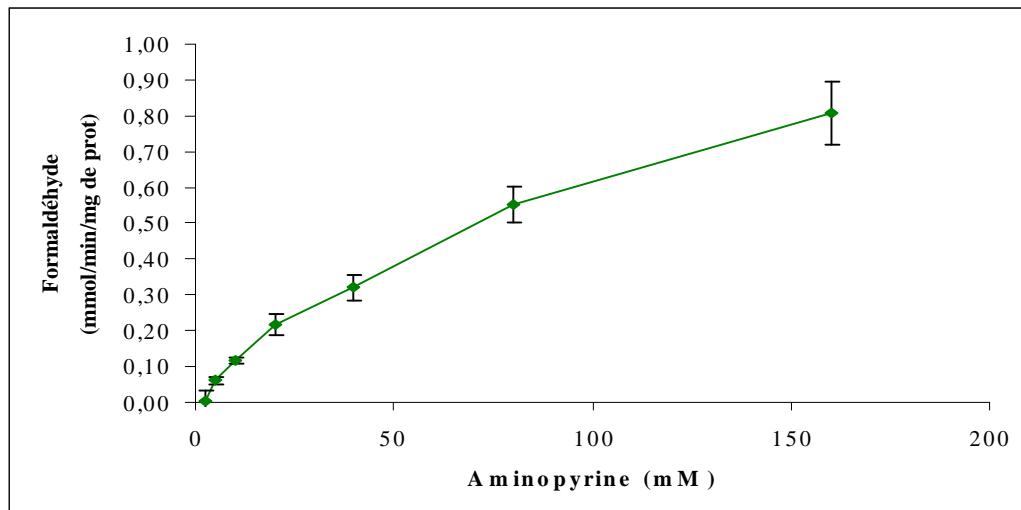


Figure 10 : Activité des N-déméthylases en fonction de la concentration en aminopyrine

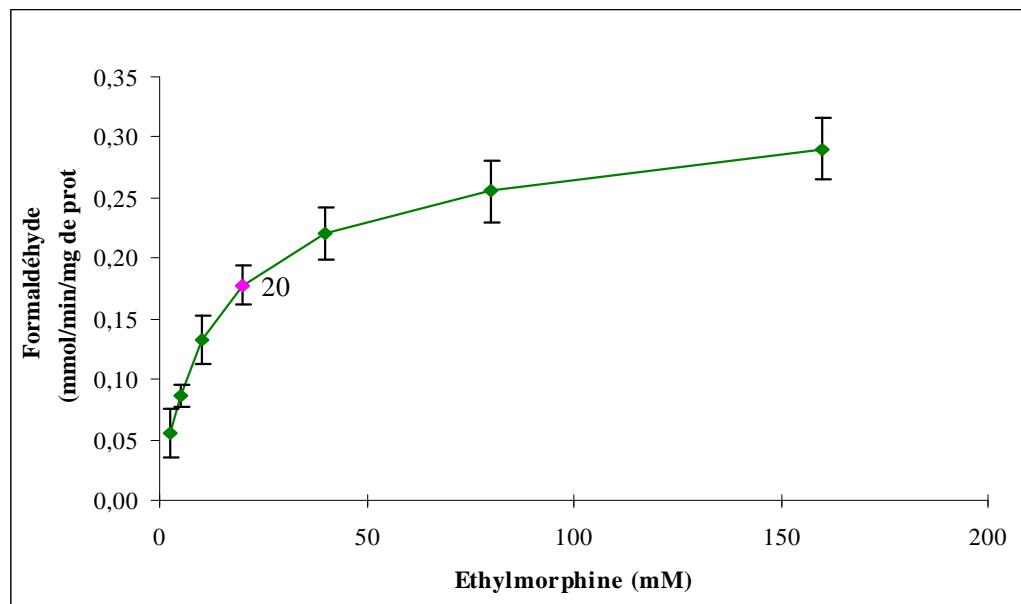


Figure 11 : Activité des N-déméthylases en fonction de la concentration en éthylmorphine

### 8.3 Activité des O-déalkylases

Le principe de ce dosage consiste en la mesure au fluorimètre de la production d'un composé fortement fluorescent, la résorufine, suite à la déméthylation de la méthoxyrésorufine par la MROD (métoxyrésorufine O démethylase), la dééthylation de l'éthoxyrésorufine par l'EROD

(étoxyrésorufine O dééthylase) ou la dépenthylation de la pentoxyrésorufine par la PROD (pentoxyrésorufine O dépenthytlase) [37].

- On introduit dans des tubes eppendorf de 2 ml un volume correspondant à 0,5 mg de protéines microsomaies, 20 µl de NADPH à 40 mM et du tampon TRIS/HCl à pH 8,4 (QSP 930 µl).
- On préincube à 40°C pendant 5 min.
- On ajoute ensuite le substrat (concentration finale : 8,5 µM) et on incube 10 min à la même température.
- Afin de faire précipiter les protéines, 500 µl de baryte de sodium saturé et 500 µl de ZnSO<sub>4</sub> à 5 % sont ajoutés. On mélange au vortex afin d'arrêter la réaction puis on centrifuge 5 min à 10000g.
- On récolte 500 µl de surnageant et on ajoute 1000 µl de tampon glycine-NaOH.
- On mesure ensuite la fluorescence (excitation : 535, émission : 582).
- Une gamme sans substrat est réalisée dans les mêmes conditions à l'aide de résorufine.

Un exemple de courbe d'étalonnage ainsi obtenu est donné dans la figure 12.

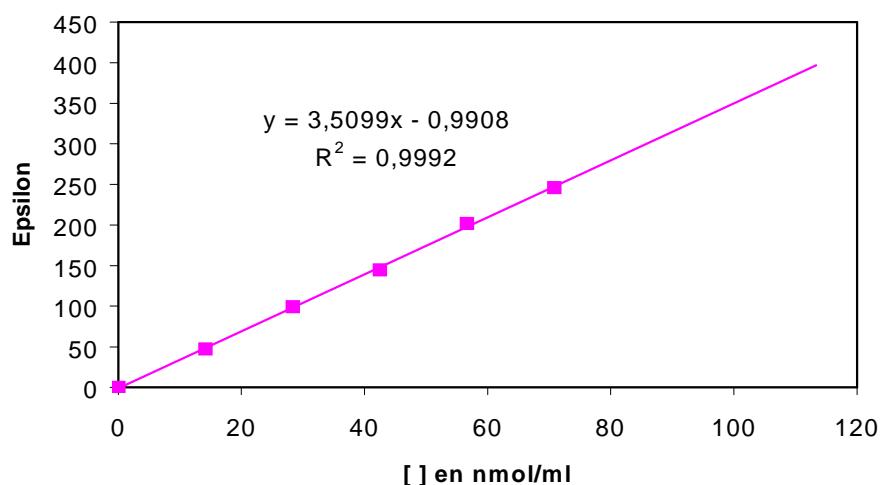


Figure 12 : gamme d' étalonnage pour l' activité des Oéthylases

L'activité des O-déalkylases est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$A = \frac{x}{Q * t}$$

avec : A : activité en nmol/min/mg

Q : concentration des protéines en mg/ml

t : temps d'incubation en minutes

Comme pour les activités de N-déméthylation, la concentration en substrat a été déterminée par des dosages sur un pool des doses témoins. Il en ressort que l'activité enzymatique est maximale pour une concentration en substrat de 8,5 µM (figure 13).

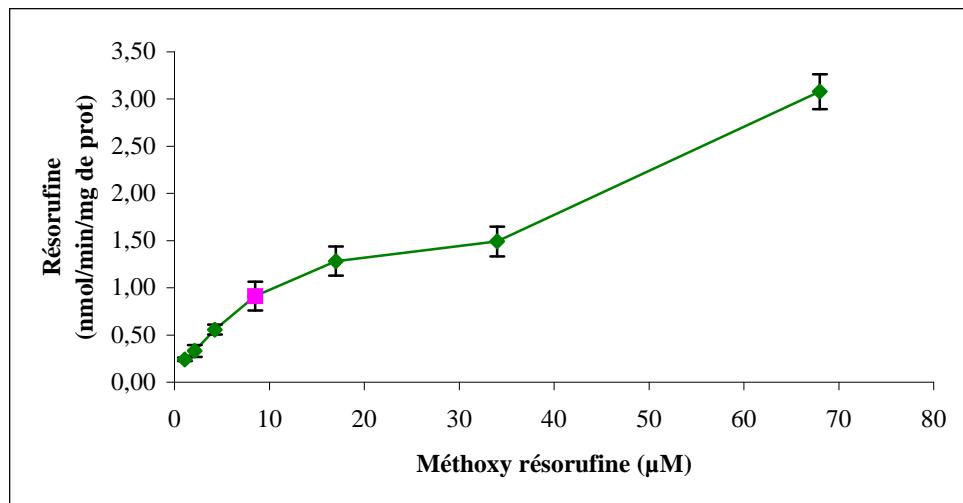


Figure 13 : Activité de la MROD en fonction de la concentration en méthoxy résorufine

## 8.4 Activité de l'aniline hydroxylase

On utilise pour le dosage de l'activité de l'aniline hydroxylase la méthode de Nebert [52].

- On introduit dans des tubes eppendorf de 2 ml, 1 à 4 mg de protéines microsomaux, 5 µl d'aniline à 0,25 M ainsi que 12,5 µl de NADPH à 40 mM. On complète à 500 µl avec du tampon à 0,1 M et pH 7,6.
- On incube 30 min à 37 °C, puis on met sur la glace.
- Parallèlement, des blancs doivent être réalisés sans substrats.

- Les protéines sont précipitées par ajout de 150 µl de TCA à 50 % et centrifugées 5 min à 10000 g.
- On collecte 0,4 ml de surnageant auxquels on ajoute 0,4 ml de réactif au phénol et 0,4 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 1 M.
- On met ensuite 30 min à l'obscurité puis on mesure la DO à 630 nm.
- La gamme est réalisée avec une solution d'hydroxyaniline à 1 mM et une solution tampon à 0,1 M et à pH 7,6.

La figure 14 illustre un exemple type de gamme.

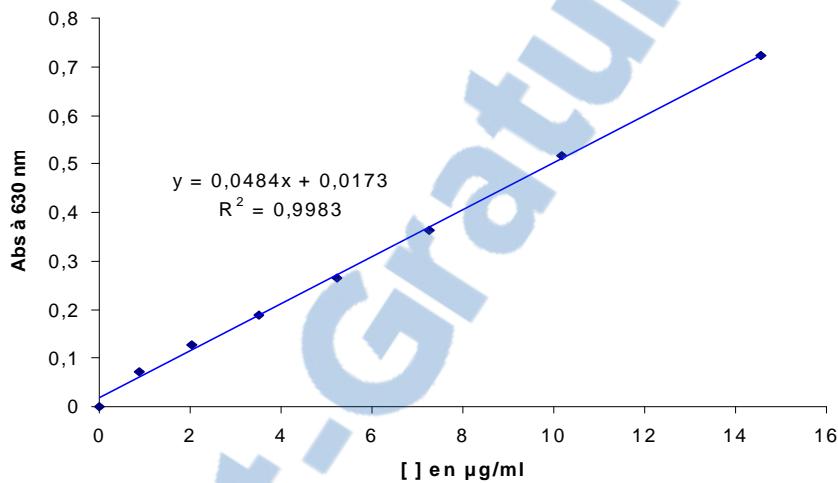


Figure 14 : Gamme d' étalonnage pour le dosage de l' aniline hydroxylase

L'activité aniline hydroxylase est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$A = \frac{x * 1000}{145.6 * t * q}$$

avec : A : activité en nmol/min/mg de protéines d'hydroxyaniline formée.

145.6 : PM de l'hydroxyaniline

t : temps d'incubation en minutes

q : mg de protéines

## 8.5 Activité de l'UDPG

Le principe est de mesurer le paranitrophénol (PNP) restant après incubation des microsomes dans un milieu tamponné contenant de l'UDPGA (acide uridine 5'diphosphoglucuronique) et du PNP [25].

Pour chaque échantillon, on prépare 3 tubes à hémolyse comme suit :

	Blanc (B)	Essai (E)	Témoin (T)
Tp Phosphate 7,4 ( $\mu$ l)	395	395	395
PNP 0,7 mM ( $\mu$ l)	-	220	220
UDPGA 5 mM ( $\mu$ l)	165	165	165
H <sub>2</sub> O	440	220	220
TCA 0,2M	-	-	2200
Microsomes ( $\mu$ l)	100	100	100

Après avoir incubé 15 minutes à 37°C, on ajoute du TCA à 0,2 M dans les blancs et les essais, puis on centrifuge 10 min à 3000 t/min. On collecte 2,7 ml de surnageant auxquels on ajoute 220  $\mu$ l de KOH à 10 N (dans chaque tube). La lecture se fait à 400 nm : on mesure d'abord le témoin contre le blanc (DO T/B), puis l'essai contre le blanc (DO E/B).

L'activité de la protéine est obtenue grâce à l'équation suivante :

$$A = \frac{DO\ T/B - DO\ E/B}{DO\ T/B} * \frac{154}{t * q}$$

avec : A : activité en nmol de PNP conjugué/min/mg de protéines

154 : nmol de PNP mises à incuber

t : durée d'incubation en min

q : quantité de protéines contenues dans 100 $\mu$ l en mg

## 8.6 Activité des GST

L'activité des glutathion transférases est obtenue par mesure de la vitesse de formation de substrats conjugués au glutathion [31].

Deux substrats peuvent être utilisés : le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le 1,2 dichloronitrobenzène (DCNB).

Le dosage se fait directement dans des cuves en quartz de 1 cm de largeur à 25 °C ou à température ambiante à une longueur d'onde de 340 nm.

- pour le CDNB, on introduit 1 ml de tampon phosphate 0,2 M à pH 6,5 avec 0,5 ml de GSH à 4 mM, 0,45 ml de cytosol dilué au 1/5000 et 50 µl de CDNB à 40 mM ajoutés au démarrage de la réaction. L'enregistrement est réalisé pendant 3 min. (Une cuve de référence permet le dosage : 0,45 ml d'eau à la place du cytosol).
- pour le DCNB, on introduit 1 ml de tampon phosphate 0,2 M à pH 7,5 avec 100 µl de GSH à 19,206 mg/ml, 50 µl de cytosol dilué au 1/100 et 100 µl de DCNB à 12,5 mM ajoutés au démarrage de la réaction. L'enregistrement se fait pendant 5 min. (De même une cuve de référence est réalisée sans cytosol).

Un exemple des courbes obtenues au cours de ce dosage est donné dans la figure 15.

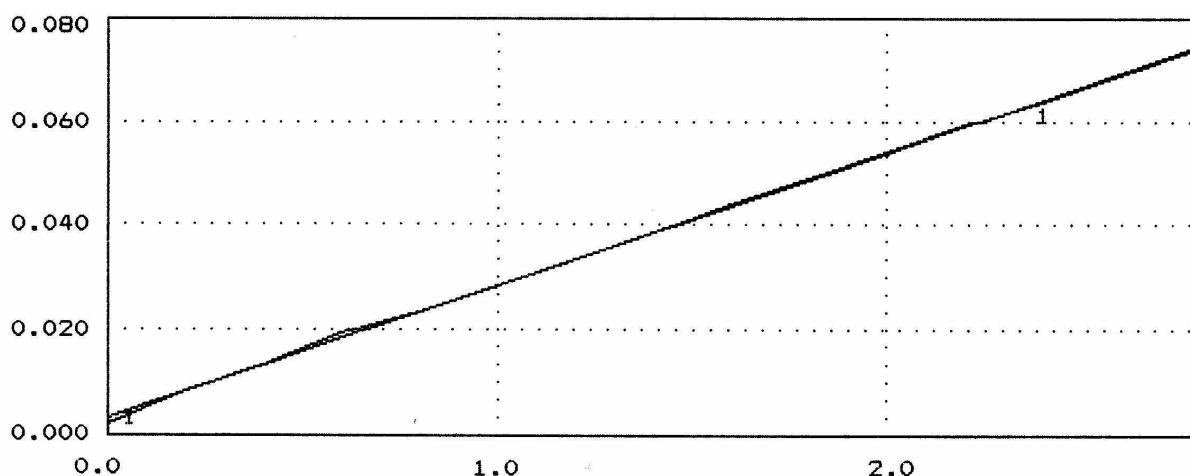


Figure 15: Cinétique de la formation du CDNB-glutathion

Les activités de conjugaison sont déterminées de la manière suivante :

$$A = \frac{\Delta DO/min * v * d}{9,6 * q}$$

avec A : µmol de substrat conjugué/min/mg de protéines

$\Delta DO/9,6$  : concentration en µmol/ml ; 9,6 correspond au coefficient d'extinction du complexe en  $mM^{-1} \cdot cm^{-1}$  (CDNB-glutathion ou DCNB-glutathion selon le cas)

v : volume total en ml (2 ml)

q : quantité de protéines en mg.



# TROISIEME PARTIE :

## RESULTATS ET DISCUSSION



## 9 EFFETS DU TRAITEMENT SUR LES CANARDS

Tout au long des 12 jours de traitement, les animaux n'ont présenté aucun signe apparent d'intoxication même pour les plus fortes doses. On ne remarque qu'une diminution du gain pondéral d'environ 30% chez les animaux traités avec 5 mg de FB1/kg/j, jusqu'à 48% pour le lot traité avec 45 mg/kg/j.

L'examen nécropsique révèle une augmentation du poids du foie. Cette augmentation est proportionnelle à la dose de fumonisines ingérée (de 30% chez les animaux traités avec 5 mg/kg/j de FB1 et de 48% chez ceux traités à 45 mg/kg/j). La mesure des différents paramètres biochimiques plasmatiques, alanine aminotransférase (ALAT), gamma glutamyltransférase (gamma-GT) et lactate déshydrogénase (LDH), confirme la souffrance hépatique (augmentations respectives de 158, 95,2 et 288% pour 5 mg/kg/j de FB1 et de 216, 83,3 et 432% pour 45 mg/kg/j de FB1) déjà décrite dans toutes les espèces étudiées [70].

Paramètre	Témoin	5 mg/kg/j	15 mg/kg/j	45 mg/kg/j
ALAT (U 37)	22,4 ± 6,35	57,8 ± 17,81 *	69,8 ± 13,27 *	70,8 ± 6,02 *
Gamma-GT (U 37)	8,4 ± 0,55	16,4 ± 4,28 *	17,8 ± 2,12 *	15,4 ± 1,67 *
LDH (U 37)	2115 ± 651	8203 ± 2365 *	9305 ± 3513 *	11250 ± 0 *
Protéines totales (g/l)	42,2 ± 2,77	52 ± 2,35 *	58,8 ± 5,07 *	60,2 ± 3,71 *
Cholestérol (U 37)	4,48 ± 0,40	8,45 ± 1,85 *	11,28 ± 0,71 *	13,16 ± 1,18 *
Triglycérides (mmol/l)	1,3 ± 0,21	1,86 ± 0,35	1,82 ± 0,50	2,0 ± 0,62
Créatinine (μmol/l)	13,2 ± 0,45	15 ± 1,41	14,6 ± 1,52	16 ± 2,35
Urée (mmol/l)	0,96 ± 0,01	0,98 ± 0,03	0,97 ± 0,04	0,97 ± 0,02
Sodium (mmol/l)	142,6 ± 1,67	145,4 ± 4,62	141,2 ± 6,02	142,6 ± 1,82
Potassium (mmol/l)	2,39 ± 0,56	2,85 ± 1,04	3,24 ± 1,14	2,68 ± 0,68
Chlorures (mmol/l)	106,6 ± 1,67	107,8 ± 4,44	107,2 ± 2,28	104 ± 1,87
Bicarbonates (mmol/l)	20,8 ± 1,48	21,6 ± 1,67	21,2 ± 1,79	19,6 ± 3,58

\* : différence significative par rapport aux témoins ( $p < 0,005$ )

Tableau XVI : Paramètres biochimiques des différents groupes d'animaux

Les concentrations plasmatiques en protéines totales et en cholestérol sont également augmentées (augmentations respectives de 23 et 89% pour 5 mg/kg/j et de 43% et 194% pour 45 mg/kg/j). Par contre, les autres paramètres tels les triglycérides, la créatinine, l'urée, le sodium, le potassium, les chlorures et les bicarbonates ne subissent pas de modifications significatives (Tableau XVI).

## 10 EFFETS DES FUMONISINES SUR LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION

Pour les différentes doses de fumonisine testées, les concentrations en cytochromes b5 et P450 totaux ne subissent aucune variation (tableau XVII). Ceci est en accord avec les résultats obtenus chez le rat [47].

Cytochrome	Témoin	5 mg de FB1/kg/j	15 mg de FB1/kg/j	45 mg de FB1/kg/j
P450 <sup>(a)</sup>	0,214 ± 0,101	0,119 ± 0,012	0,154 ± 0,018	0,202 ± 0,052
b5 <sup>(a)</sup>	0,336 ± 0,112	0,450 ± 0,052	0,445 ± 0,091	0,398 ± 0,076

(a) en nmoles/mg de protéines

Tableau XVII : Effets de la FB1 sur les concentrations en cytochromes P450 et b5

### 10.1 Les enzymes hépatiques

Les différents résultats obtenus sont résumés dans les figures 17 et 18.

Les activités de N-déméthylation de l'érythromycine et de l'éthylmorphine sont augmentées de façon dose-dépendante sous l'effet du traitement (respectivement de 92 et 241% pour 5mg/kg/j, à 290 et 969% pour 45mg/kg/j). Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Martinez chez le rat [47]. Dans cette espèce, ces deux substrats sont spécifiques des P450 3A [57], alors qu'aucune forme de P450 utilisant ces substrats n'a été décrite chez les oiseaux [89]. La très forte induction obtenue nous a conduit à déterminer si le phénomène observé concernait une ou plusieurs enzymes. Nous avons, pour cela, étudié l'activité de l'éthylmorphine N-déméthylase en fonction de la concentration en substrat. Trois déterminations ont été effectuées en duplicates sur deux pools d'échantillons (le mélange des 5 échantillons témoins d'une part, et le mélange des 5 échantillons du lot traité à 45 mg/kg/j d'autre part) avec un temps d'incubation égal à 20 mn afin d'être en vitesse initiale (Figure 16). L'évolution des activités enzymatiques en fonction de la concentration en substrat est représentée dans la figure 19.

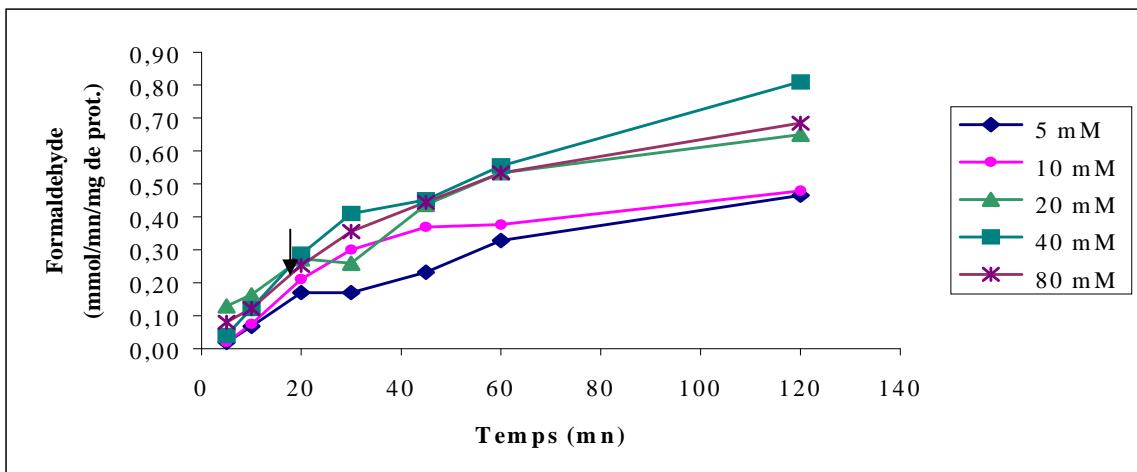


Figure 16 : Evolution de l'activité de l'éthylmorphine N-déméthylase en fonction du temps d'incubation

Les  $V_m$  et  $K_m$  ont ensuite été déterminées par modélisation grâce au logiciel scientist selon une équation de Michaelis-Menten. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XVIII. Les forts coefficients de corrélation ( $R$ ) et de détermination ( $CD$ ) observés pour chaque essai suggèrent qu'une seule enzyme est impliquée dans la réaction. La comparaison des paramètres cinétiques obtenus chez les animaux témoins et ceux traités à la dose de 45 mg de FB1/kg/j révèle des différences beaucoup plus importantes pour les  $V_m$  que pour les  $K_m$ . Les résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité de l'éthylmorphine N-déméthylase, observée chez les animaux traités par la FB1, est probablement liée à une augmentation de l'expression microsomale de cette enzyme. Cette hypothèse devra être ultérieurement confirmée par Western Blot.

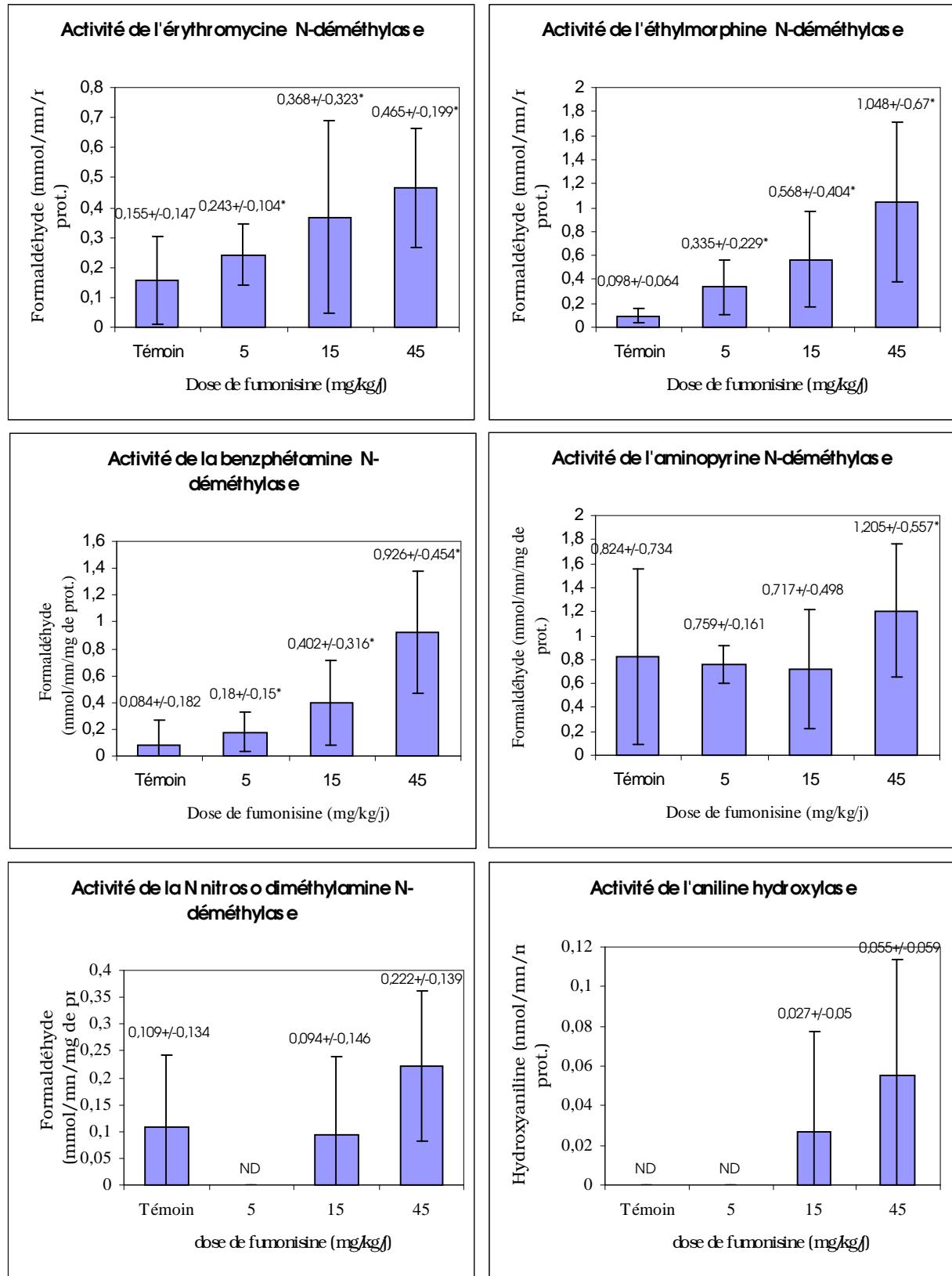


Figure 17 : Activités hépatiques des N-déméthylases (pour l'aminopyrine, la benzphetamine, l'érythromycine, l'éthylmorphine et la N nitroso diméthylamine) et de l'aniline hydroxylase

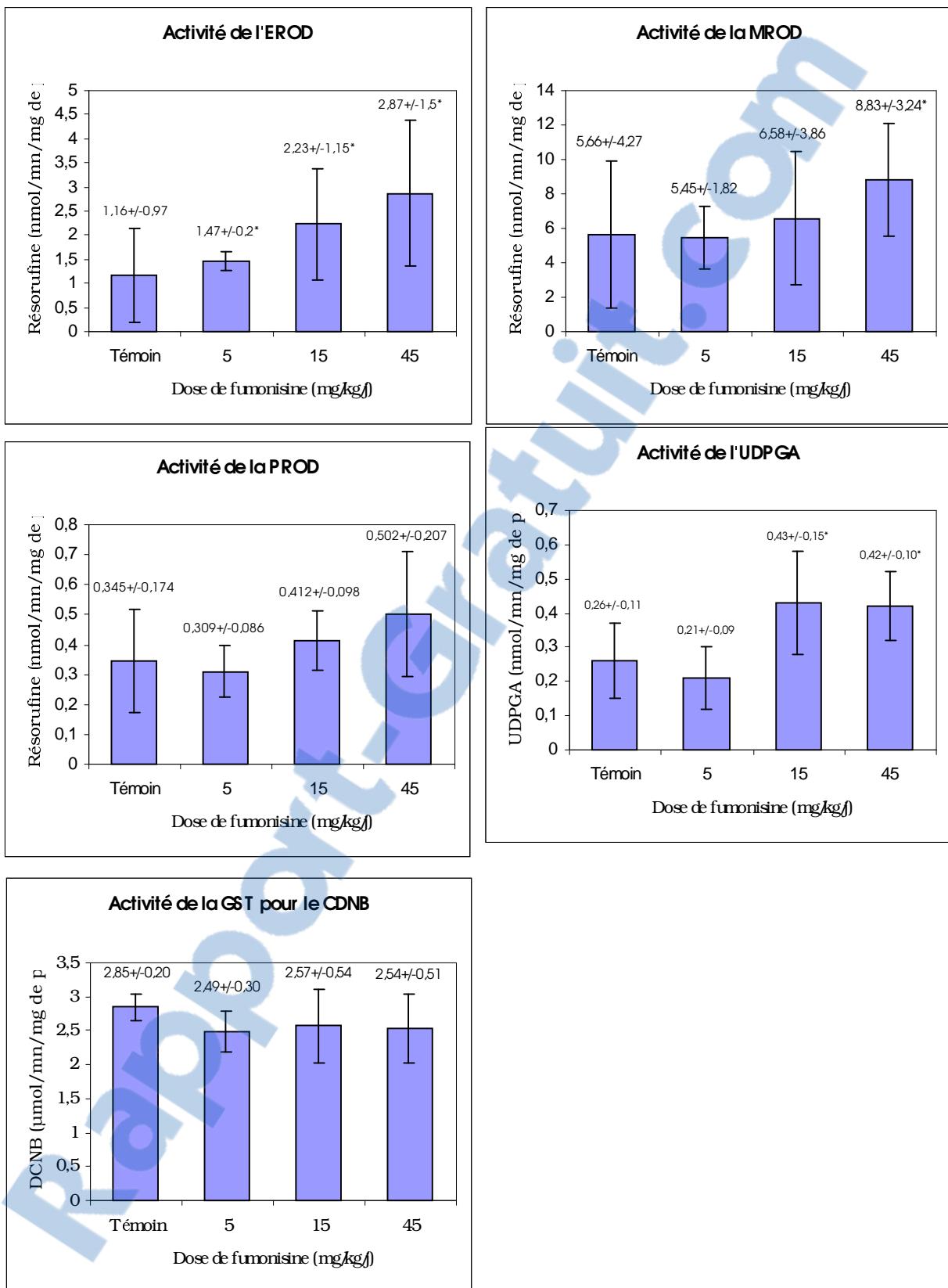


Figure 18 : Activités hépatiques des O-déalkylases (EROD, MROD et PROD) et des enzymes de phase II (UDPGA ET GST)

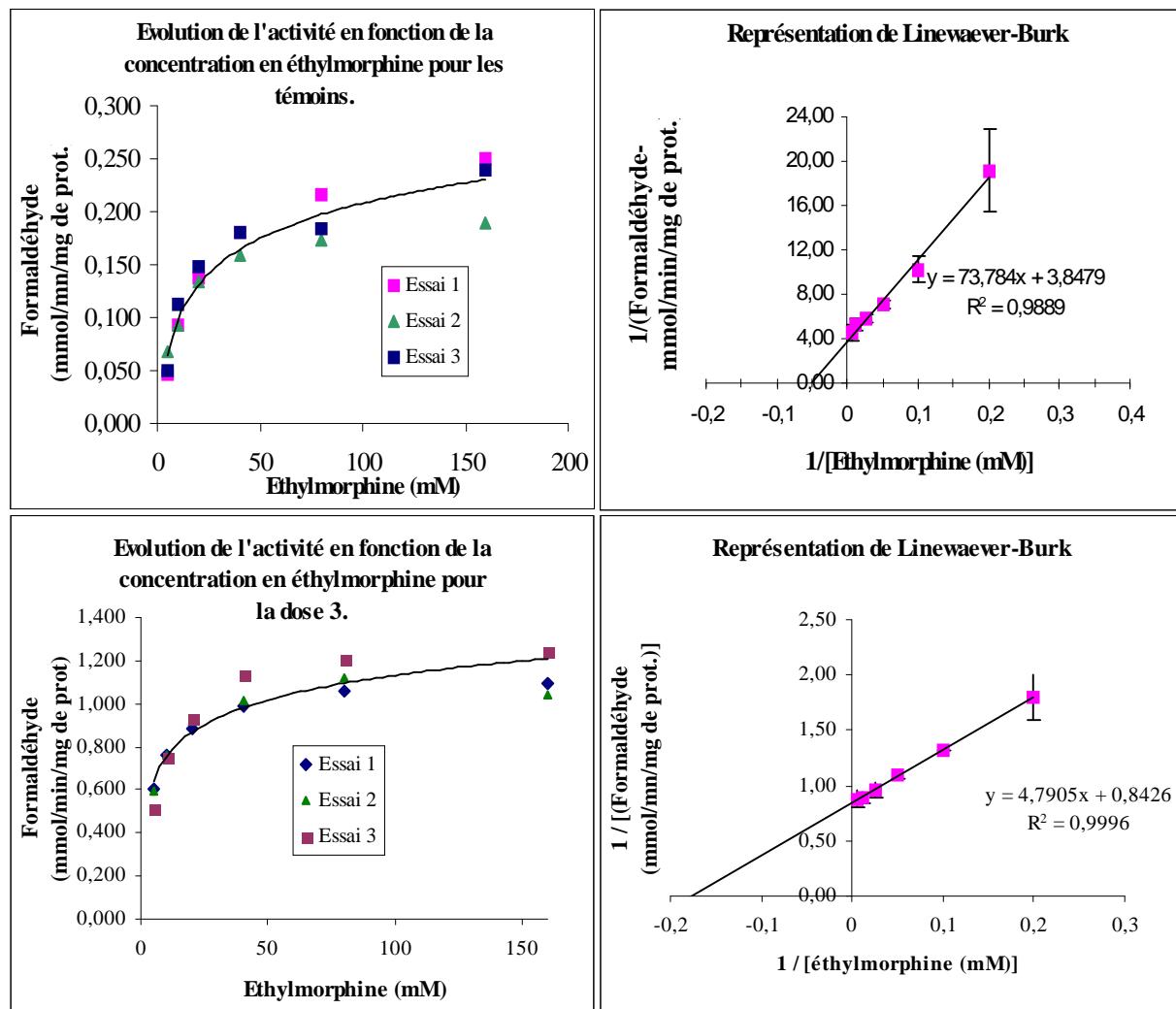


Figure 19 : Activité de l'éthylmorphine N-déméthylase en fonction de la concentration en substrat pour les témoins et la dose de 45 mg/kg/j.

		Km (mM)	Vm (mmol/mn/mg)	R	CD	Dispersion 95 % Km	Dispersion 95 % Vm
Essai 1	Témoin	21,77	0,28	0,9994	0,9964	17,39 – 26,16	0,26 – 0,30
	45 mg/kg/j	4,49	1,11	0,9998	0,9956	3,87 – 5,10	1,08 – 1,14
Essai 2	Témoin	10,55	0,20	0,9995	0,9947	8,51 – 12,6	0,19 – 0,21
	45 mg/kg/j	4,53	1,12	0,9988	0,9699	2,86 – 6,19	1,05 – 1,20
Essai 3	Témoin	14,18	0,24	0,9925	0,9441	3,93 – 24,4	0,19 – 0,29
	45 mg/kg/j	7,66	1,32	0,9998	0,997	6,64 – 8,68	1,28 – 1,36
Moyenne	Témoin	15,18	0,24	0,9895	0,9246	10,23 – 20,13	0,22 – 0,26
	45 mg/kg/j	5,50	1,18	0,9967	0,9329	4,26 – 6,73	1,13 – 1,25

Tableau XVIII : Paramètres cinétiques de l'activité éthylmorphine N-déméthylase chez les animaux témoins et traités par 45 mg/kg/j de FB1.

Une autre N-déméthylase à subir une induction dose-dépendante est la benzphétamine N-déméthylase avec une augmentation de 122% pour 5mg/kg/j de FB1 à 811% pour 45 mg/kg/j par rapport au lot témoin. Aucune donnée concernant l'effet des fumonisines sur cette activité n'est disponible chez le rat. Cette activité est attribuée à la sous-famille des P450 2B chez le rat et des P450 2H chez les oiseaux. Afin de déterminer le nombre d'enzymes mises en jeu dans cette induction, nous avons réitéré l'expérience menée pour l'éthylmorphine N-déméthylase en utilisant un temps d'incubation de 20 mn (figure 20). Les activités sur le pool des microsomes témoins étant trop faibles pour permettre un calcul des Vm et Km, nous nous sommes limités à l'étude du pool d'échantillons du lot traité à 45 mg de FB1/kg/j (figure 21).

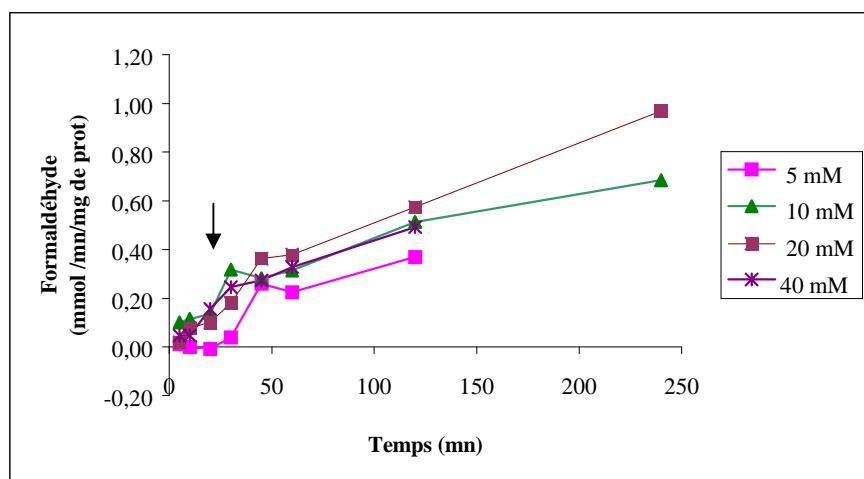


Figure 20 : Evolution de l'activité de la benzphétamine N-déméthylase en fonction du temps d'incubation.

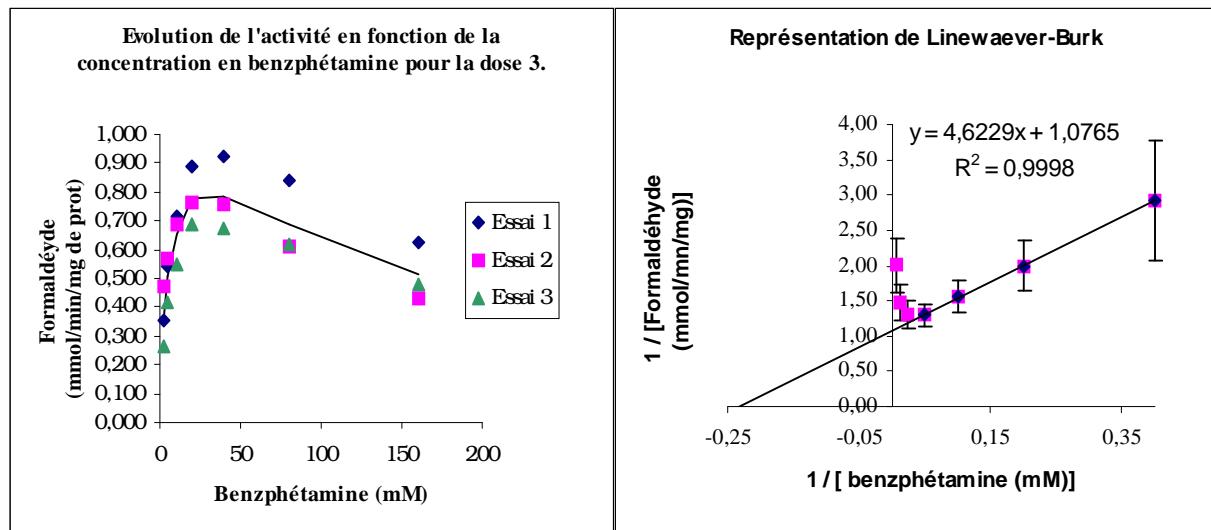


Figure 21 : Activité de la benzphétamine N-déméthylase en fonction de la concentration en substrat.

On peut observer, pour les concentrations en substrats supérieures à 40 mM, une chute de l'activité de l'enzyme. Cette inhibition est probablement due à la présence d'un excès de substrat

entraînant des phénomènes de compétition et de mauvaises fixations du substrat au site actif de l'enzyme [61].

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Km (mM)	7,09	3,11	6,79
Vm (mmol/mn/mg)	1,31	0,99	0,98
Ki (mM)	158,62	136,13	157,83
R	0,9997	0,9985	0,9996
CD	0,9959	0,9613	0,9942
Dispersion Km 95 %	5,45 – 8,73	2,20 – 4,01	4,71 – 8,87
Dispersion Vm 95 %	1,17 – 1,44	0,89 – 1,08	0,85 – 1,11
Dispersion Ki 95 %	112,83 – 204,4	95,9 – 176,32	97,95 – 217,71

Tableau XIX : Paramètres cinétiques de l'activité benzphétamine N-déméthylase chez les animaux traités par 45 mg/kg/j de FB1.

Les paramètres cinétiques de l'activité benzphétamine N-déméthylase ont été déterminés par modélisation en tenant compte de l'inhibition :  $v = V_m / (K_m/S + 1 + S/K_i)$  avec v la vitesse de la réaction,  $V_m$  la constante de vitesse,  $K_m$  la constante d'affinité,  $K_i$  la constante d'inhibition et  $S$  la concentration en substrat. Les valeurs de ces différents paramètres sont présentées dans le tableau XIX. Là encore, les forts coefficients de corrélation (R) et de détermination (CD) observés pour chaque essai suggèrent qu'une seule enzyme est impliquée dans la réaction. On peut enfin observer que la constante d'inhibition est très élevée puisque elle est supérieure de plus de 20 % à la constante d'affinité dans les trois essais réalisés. Il sera intéressant par la suite de réaliser des Western Blots afin de savoir si la même enzyme est concernée chez les canards témoins et chez les canards traités.

En ce qui concerne l'activité aminopyrine N-déméthylase, une faible augmentation est constatée après administration de 45 mg/kg/j de FB1 (augmentation de 61%). Chez le rat cette activité est spécifique du P450 2C3 [57], alors que chez les oiseaux elle est corrélée aux P450 MC inducibles, apparentés à la sous-famille 1A [89].

La dernière activité de N-déméthylation explorée, la N-nitroso diméthylamine N-déméthylase, ne peut être quantifiée chez les témoins et les traités à la dose de 5 mg/kg/j et de 15 mg/kg/j. Cependant, pour les animaux traités avec 45 mg de FB1/kg/j, cette activité devient nettement exprimée. Chez le rat, elle est corrélée à l'expression des P450 2E [57] mais également des P450 1A2. Les effets des fumonisines n'ont jamais été explorés au préalable sur cette activité.

En ce qui concerne les activités des O-déalkylases, l'activité de l'EROD est augmentée de 147% pour le lot traité avec 45 mg/kg/j. Cet effet est par ailleurs dose-dépendant. Les résultats

sont similaires à ceux obtenus chez le rat [47]. Chez les volailles, l'EROD est un substrat pour le P448 L que l'on peut appartenir au P450 1A du rat [89].

L'activité de la MROD n'est augmentée de façon significative que pour un traitement avec 45 mg de FB1 /kg/j (augmentation de 56%). Il est à noter que chez le rat l'activité de la MROD ne subissait aucune modification [47]. Cette activité est associée au P450 1A chez le rat [57]. Aucune information sur les enzymes impliquées n'est disponible chez le canard.

L'activité de la PROD est sensiblement augmentée, sans toutefois que cet effet soit significatif. Chez le rat, pour qui cette enzyme correspond au P450 2B1 [57], les fumonisines sont également sans effet [47]. La spécificité des P450 impliqués dans la dépenthylation de la pentoxyrésorufine est inconnue chez le canard.

L'activité aniline hydroxylase, non exprimée chez les témoins, devient détectable dès la dose de 15 mg/kg/j de fumonidine. Chez le rat, cette activité est essentiellement attribuée au P450 2E [57]. Chez les oiseaux, elle est en revanche spécifique des P450 MC inducibles apparentés aux P450 1A [89].

Ainsi, l'EROD, l'aniline, l'aminopyrine et sans doute la MROD sont, chez les oiseaux, des substrats pour des P450 apparentés à la sous-famille 1A chez le rat. Toutes ces activités sont augmentées après un traitement avec des fumonisines, ce qui suggère une induction de cette sous-famille chez le canard. La confirmation de cette hypothèse devra être apportée par Western Blot. Néanmoins, il est intéressant de se demander par quels mécanismes les fumonisines peuvent conduire à une induction de ces cytochromes. En effet, les inducteurs des P450 1A sont le plus souvent de type 3MC et passent par la liaison au récepteur Ah [57]. Ces inducteurs doivent répondre à certains critères (liposolubilité, structure polycyclique planaire, dimension moléculaire proche de celle du 3MC et une distribution des charges appropriée avec, le plus souvent, des substitutions halogénées). Or, les fumonisines étant loin de présenter ces caractéristiques, il paraît peu probable que l'induction observée suive la voie classiquement décrite mettant en jeu le récepteur Ah. En parallèle des inducteurs de type 3MC, une augmentation de l'expression des P450 1A ne mettant pas en jeu le récepteur Ah a été décrite pour certains composés de la famille des benzimidazoles [1, 39] et certains isomères du bêta-carotène (cantaxanthine, bêta-apo-8'-caroténal) [30, 3]. Ces molécules ne se lieraient pas au récepteur Ah mais sa présence serait indispensable.

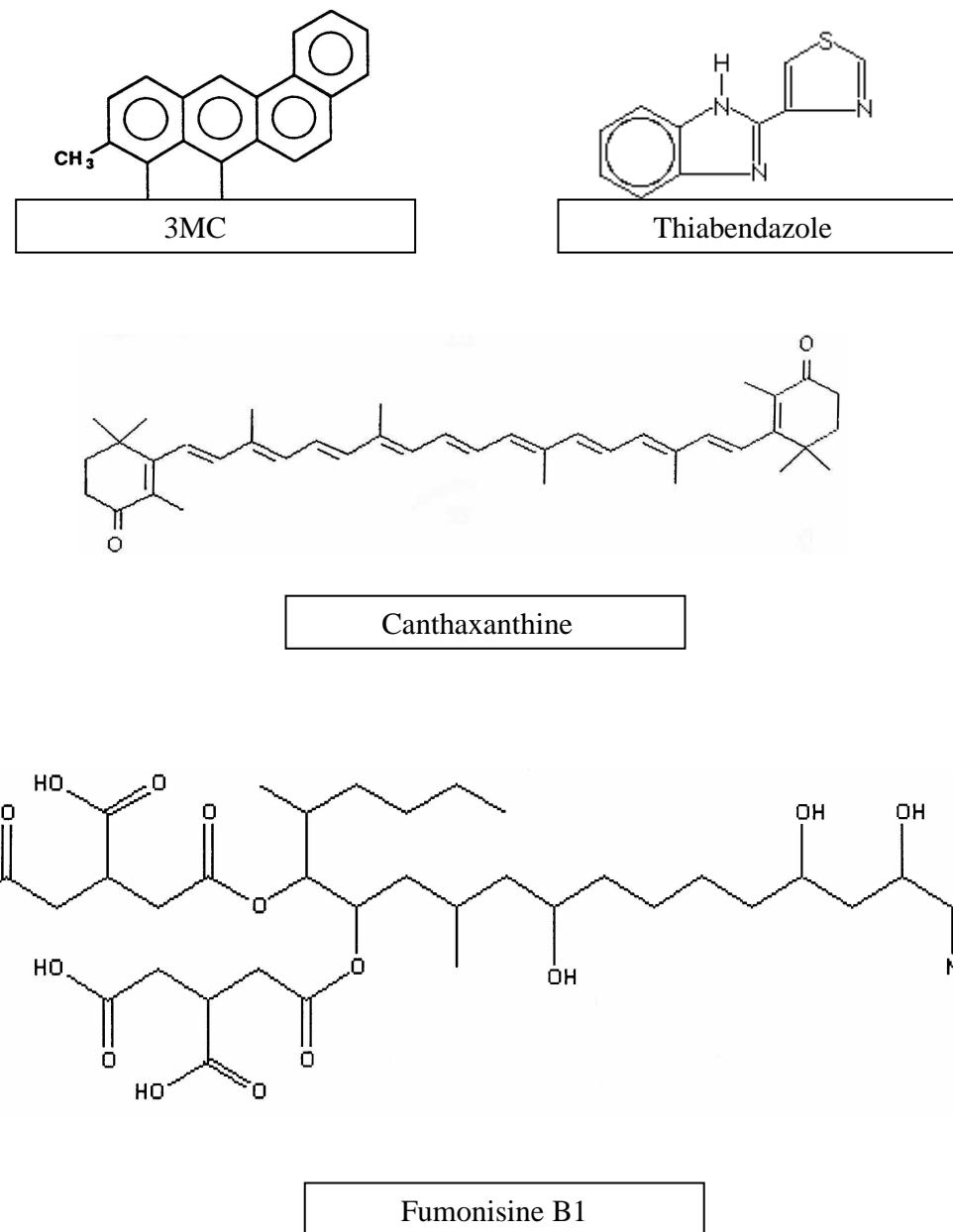


Figure 22 : Structures du 3MC, du thiabendazole, de la canthaxanthine et de la fumonisine B1.

La comparaison des structures du 3MC, du thiabendazole, de la canthaxanthine et de la fumonisine B1 suggère que si les fumonisines augmentent l'expression des P450 1A, la recherche du mécanisme impliqué devra prendre en compte la possibilité d'une induction non liée au récepteur Ah (Figure 22).

Les effets des fumonisines ont également été explorés sur certaines activités de phase II. L'activité de l'UDPGA est significativement augmentée à partir de 15 mg/kg/j (+65%). Les activités de la GST, aussi bien pour le CDNB que pour le DCNB, ne sont que très modérément affectées. Aucune donnée concernant les effets des fumonisines sur ces enzymes n'est disponible dans les autres espèces.

## 10.2 Les enzymes rénales

Les effets des fumonisines ont également été explorés sur les enzymes de biotransformation exprimées dans les reins (figure 23). On peut remarquer que ces activités enzymatiques sont plus difficilement détectables que dans le foie. Les effets du traitement sont par ailleurs moins marqués.

La seule enzyme pour laquelle l'activité est augmentée est l'érythromycine N-déméthylase. L'effet devient significatif à partir de 15 mg de FB1/kg/j, l'activité présentant une augmentation de 409% pour la dose de 45mg/kg/j. Des effets similaires ont été obtenus chez le rat [47].

L'activité de l'aminopyrine N-déméthylase reste en revanche constante quelle que soit la dose utilisée. La N nitroso diméthylamine N-déméthylase n'est quant à elle pas quantifiable de même que l'activité aniline hydroxylase. Chez le rat, les activités de N-déméthylation de l'aminopyrine et d'hydroxylation de l'aniline sont induites [47]. La N nitroso diméthylamine N-déméthylase n'a pas été explorée chez le rat.

Paradoxalement, on peut noter que l'activité de l'EROD, qui était augmentée dans le foie, est diminuée et devient même non détectable à partir de 15mg/kg/j. Chez le rat, cette activité est induite [47]. Parallèlement, les activités de la MROD et de la PROD diminuent dès la dose 5mg/kg/j (respectivement de 51% et de 28%), pour atteindre une diminution respective de 60% et de 91% à 45mg/kg/j, alors qu'elles ne sont pas affectées chez le rat [47]. Ces enzymes subissent donc des variations opposées selon leur localisation rénale ou hépatique. De tels phénomènes ont déjà été décrits, comme dans l'étude des effets de l'infestation par *F.hepatica* chez le rat [9]. Les mécanismes de ces variations « compensatoires » demeurent inconnus.

Comme pour le foie, l'activité de la GSH transférase avec le CDNB pour substrat n'est pas affectée par le traitement. Aucune activité ne peut être détectée lorsque du DCNB est utilisé. Ces activités n'ont pas été étudiées chez le rat.

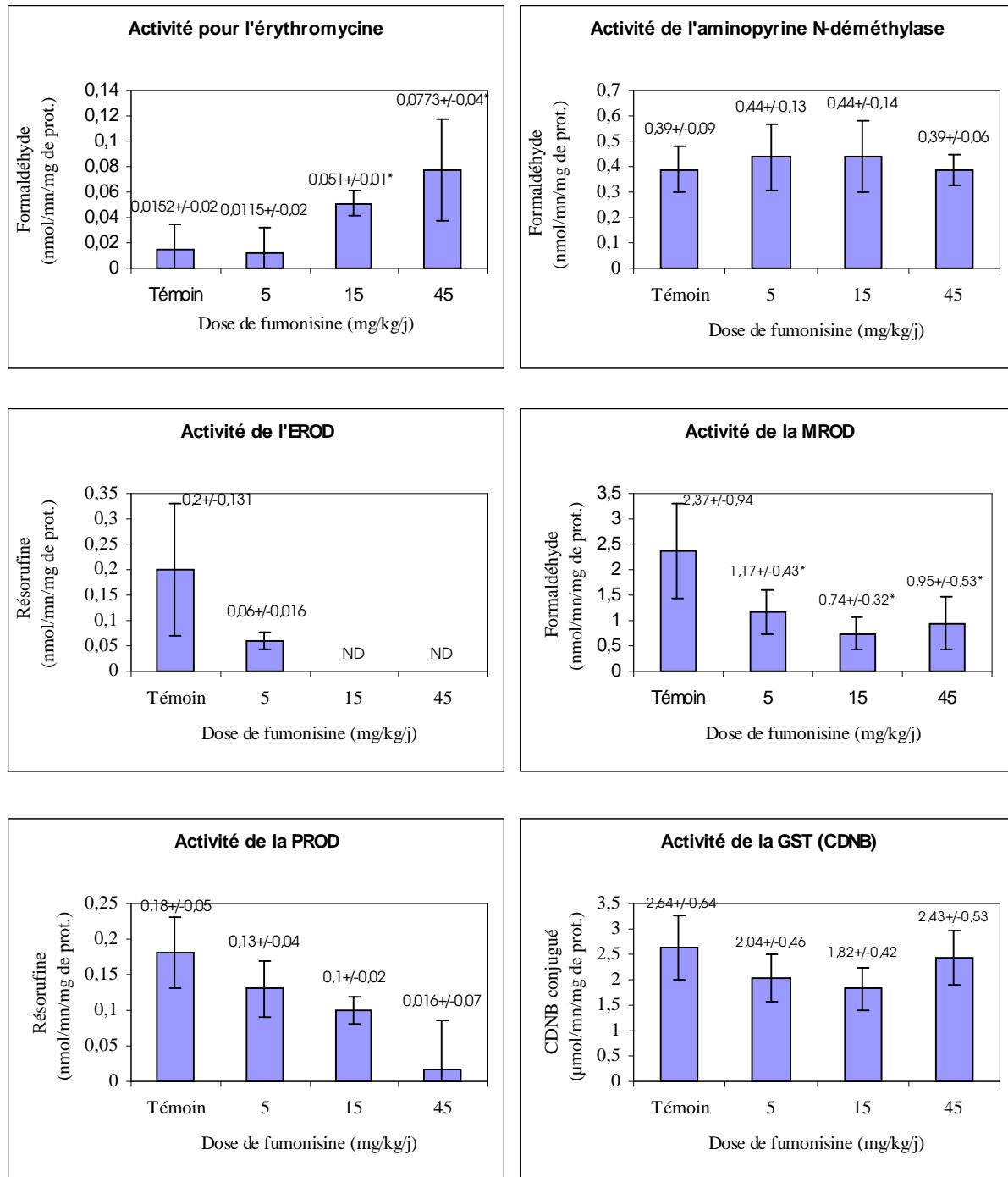


Figure 23 : Activités rénales des N-déméthylases, des O-déalkylases et de la GST

## CONCLUSION

Il ressort de cette étude que les fumonisines modifient l'activité des enzymes de biotransformation chez le canard. De tels effets, déjà observés chez le rat [45], n'avaient jamais été décrits dans cette espèce, néanmoins très exposée à la toxicité de ces contaminants.

Parmi les enzymes de biotransformation explorées, seules les enzymes de phase I sont affectées, 2 groupes pouvant être différenciés :

- Le groupe constitué par les activités aminopyrine N-déméthylase, EROD, MROD et aniline hydroxylase, augmentées dans le foie et diminuées dans les reins (l'activité aminopyrine reste constante), qui correspond à des enzymes dont le niveau d'expression peut être associé à celui des P450 1A. Les fumonisines étant connues pour induire ces cytochromes chez le rat, des western blot seront réalisés afin de déterminer si l'augmentation des activités observée est également liée à une induction de ces protéines chez le canard. Si tel est bien le cas, la recherche des mécanismes d'action des fumonisines pourra être effectuée dans cette espèce animale, ou sur modèle *in vitro*.

- Le groupe constitué par les activités éthylmorphine et benzphétamine N-déméthylases, très fortement augmentées par les fumonisines, mais pour lequel aucune information n'est disponible concernant les P450 impliqués chez le canard. L'intensité des effets observés et le fait que dans chaque cas, une seule enzyme semble impliquée, suggèrent un effet spécifique des fumonisines. Des études complémentaires pourront être conduites dans d'autres espèces animales, dont l'expression des P450 est mieux connue, afin de déterminer si de tels effets sont associés à une modification de l'expression de ces protéines. Ces effets étant apparents dès la dose de 5mg/kg/j, malgré d'importantes variations individuelles par ailleurs déjà décrites dans cette espèce [71], des études ultérieures seront réalisées afin de déterminer si une toxicité cumulative peut être observée lors d'administrations de très faibles doses de fumonisines (<1mg/kg/j) pendant toute la période de croissance de l'animal. De telles études pourraient être importantes dans la détermination de doses sans effet dans cette espèce, qui pourrait ainsi être reconnue comme un modèle expérimental particulièrement sensible à la toxicité des fumonisines.



## BIBLIOGRAPHIE

1. AIX L., REY-GROBELLET X., LARRIEU G. et al. – Thiabendazole is an inducer of cytochrome P450 1A1 in cultured rabbit hepatocytes. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **202**(3), 1483 – 1489.
2. ALBERTS J.F., GELDERBLOM W.C., THIEL P.G. et al. – Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. – *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 6, 1729 – 1733.
3. ASTORG P., GRADELET S., LECLERC J. et al. – Effects of beta-carotene and canthaxanthin on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. – *Chem. Toxicol.*, 1994, **32**(8), 735 – 742.
4. BAILEY T.A., JOHN A., MENSAH-BROWN E.P. et al. – Drug metabolizing enzyme systems in the oubara bustard (*Chlamydias undulata*). – *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998, **120C**, 365 – 372.
5. BAILLY J.D., RAYMOND I., LE BARS P. et al. – Leucoencéphalomalacie des équidés. Cas rapportés au CNITV. – *Rev. Med. Vet.*, 1996, **147**, 11, 787 – 796.
6. BEIER R.C., ELISSADE M.H., STANKER L.H. – Calculated three dimensional structures of the fumonisin B1-4 mycotoxins. – *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1995, **54**, 4, 479 – 487.
7. BERMUDEZ A.J., LEDOUX D.R., ROTTINGHAUS G.E. – Effects of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducklings. – *Avian diseases*, 1995, **39**, 879 – 886.
8. BEZUIDENHOUT S., GELDERBLOM W., GORST-ALLMAN C. et al. – Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. – *J. Chem. Commun.*, 1988, 743 – 745.
9. BIRO-SAUVER B., EECKOUTTE C., BAEZA E. et al. – Comparison of hepatic and extrahepatic drug-metabolizing enzyme activities in rats given single or multiple challenge infections with *Fasciola hepatica*. – *Int. J. Parasitol.*, 1995, **25**(10), 1193 – 1200.

10. BLACKWELL B.A., GILLIAM J.T., SAVARD M.E. et al. – Oxydative deamination of hydrolysed fumonisin B(1) (AP(1)) by cultures of *Exophiala spinifera*. – *Nat. Toxins*, 1999, **7**, 31 – 38.
11. BONDY G., SUZUKI C., BARKER M. et al. – Toxicity of fumonisin B1 administered intraperitoneally to male Sprague-Dawley rats. – *Fd. Chem. Toxic.*, 1995, **33**, 8, 653 – 665.
12. BOYER T.D., KENNEY W.C. – Preparation, characterization, and properties of glutathione S-Transferase. – In : ZAKIM D., VESSEY D.A. – *Biochemical pharmacology and toxicology* – New York : Wiley-Interscience, 1985, Vol 1, Chap 6, 297 – 355.
13. BRANHAM B.E., PLATTNER R.D. – Alanine is a precursor in the biosynthesis of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. – *Mycopathologia*, 1993, **124**, 2, 99 – 104.
14. BROWN T.P., ROTTINGHAUS G.E., WILLIAMS M.E. – Fumonisin mycotoxicosis in broilers : performance and pathology. – *Avian diseases*, 1992, **36**, 450 – 454.
15. BUCCI T.J., HANSEN D.K., LABORDE J.B. – Leucoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B1. – *Natural toxins*, 1996, **4**, 51 – 52.
16. CASTEGNARO M., GARREN L., GALENDO D. et al. – Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. – *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1998, **720**, 15 – 24.
17. CAWOOD M., GELDERBLOM W., ALBERTS J., SNYMAN S. – Interaction of 14C-labelled fumonisin B mycotoxins with primary rat hepatocyte cultures. – *Food Chem. Toxic.*, 1994, **32**, 7, 627 – 632.
18. COCHIN J., AXELROD J. – Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. – *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1959, **125**, 105 – 115.
19. COLVIN B.M., COOLEY A.J., BEAVER R.W. – Fumonisin toxicosis in swine : clinical and pathologic findings. – *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 232 – 241.

20. DALVI R.R., NUNN V.A., JUSKEVICH J. – Studies on comparative drug metabolism by hepatic cytochrome P450-containing microsomal enzymes in quail, ducks, geese, chickens, turkeys and rats. – *Comp. Biochem. Physiol.*, 1987, **87C**, 2, 421 – 424.
21. DUPUY J. – Principales mycotoxines produites par des souches de *Fusarium* isolées de céréales. – 229 p – Thèse : Doct. : Production animale et qualité des denrées : Toulouse, INP : 1994.
22. DUTTON M.F. – Fumonisins, mycotoxins of increasing importance : their nature and their effects. – *Pharmacol. Ther.*, 1996, **70**, 2, 137 – 161.
23. EDRINGTON T.S., KAMPS-HOLTZAPPLE C.A., HARVEY R.B. et al. – Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. – *Journal of animal science*, 1995, **73**, 508 – 515.
24. ESPADA Y., RUIZ DE COPEGUI R., CUADRADAS C., CABANES F.J. – Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and serum chemistry modifications. – *Avian diseases*, 1994, **38**, 454 – 460.
25. FREI J. – Multiplicity and specificity of UDP- glucuronyl transferase. I. Effect of divalent cations and EDTA on the activity of UDP-glucuronyl transferase assayed with bilirubin-, methyl-umbelliferone and p-nitrophenol. – *Enzymol. Biol. Clin.*, 1970, **11**, 385 – 401.
26. GALTIER P., BATTAGLIA A., MORE J., FRANC M. – Impairment of drug metabolism by the liver in experimental fasciolasis in the rat. – *J. Pharm., Pharmacol.*, 1983, **35**, 729 – 733.
27. GLEIZES C. – Induction des cytochromes P450 1A1 et 1A2 par l'oxfendazol. Régulation comparée de leur expression chez le lapin et en culture primaire d'hépatocytes. – 153 p. - Thèse : Doct. : Pharmacologie biochimique : Toulouse, 1992.
28. GOEL S., SCHUMACHER J., LENZ S.D., KEMPPAINEN B.W. – Effect of *Fusarium moniliforme* isolates on tissue and serum sphingolipid concentrations in horses. – *Vet. Human. Toxicol.*, 1996, **38**, 4, 265 - 269.
29. GONZALEZ F.J., LIU S.Y., YANO M. – Regulation of cytochrome P450 genes : molecular mechanisms. – *Pharmacogenetics*, 1993, **3**, 51 – 57.

30. GRADELET S., ASTORG P., PINEAU T. et Al. – Ah receptor-dependant CYP1A induction by two carotenoids, canthaxanthin and beta-apo-8'-carotenal, with non affinity for the TCDD binding site. – *Biochem. Pharmacol.*, 1997, **54**(2), 307 – 315.
31. HABIG W.H, PABST M.J., JAKOBY W.B. – Glutathione transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. – *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 7130 – 7139.
32. JACKSON L.S., HLYWKA J., SENTHIL K., BULLERMAN L.B. – Effect of thermal processing on the stability of fumonisins. – In : JACKSON et al. – *Fumonisins in food* – New York : Plenum Press, 1996 – Chap 30.
33. JASKIEWICZ K., MARASAS W.F., TALJAARD J.J. – Hepatitis in vervet monkeys caused by *Fusarium moniliforme*. – *J. Comp. Pathol.*, 1987, **97**, 3, 281 – 291.
34. JAVED T., RICHARD J.L., BENNETT G.A. et al. – Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos. – *Mycopathologia*, 1993, **123**, 185 – 193.
35. JEFCOATE C.R – Integration of xenobiotic metabolism in carcinogen activation and detoxication. – In : CALDWELL J., JAKOBY W.B. – *Biological basis of detoxication* – New York : Academic Press, 1983, Chap 2, 32 – 67.
36. KASPER C.B., HENTON D. – Glucuronidation. – In : JAKOBY W.B. – *Enzymatic basis of detoxication*. – New York : Academic Press, 1980, Vol 2, Chap 1, 4 – 27.
37. LAKE B.G. – Preparation and characterisation of microsomal functions for studies on xenobiotic metabolism. – In *Snell and Mullock (Ed) : Biochemical Toxicology* : IRL Press Oxford, 1987, 183 – 215.
38. LE BARS J., LE BARS P., DUPUY J., BOUDRA H. – Biotic and abiotic factors in fumonisin B1 production and stability – *Journal of AOAC International*, 1994, **77**, 2, 517 – 522.
39. LESCA P., PERYT B., LARRIEU G. et Al. – Evidence for the ligand-independent activation of the Ah receptor. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **209**(2), 474 - 482

40. LI Y.C., LEDOUX D.R., BERMUDEZ A.J. et al. – Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler chicks. – *Poult. Sci.*, 1999, **78**, 1275 – 1282.
41. LI Y.C., LEDOUX D.R., BERMUDEZ A.J. et al. – The individual and combined effects of fumonisin B1 and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poulets. – *Poult. Sci.*, 2000, **79**, 871 – 878.
42. MACKENZIE S.E., SAVARD M.E., BLACKWELL B.A., MILLER J.D., APSIMON J.W. – Isolation of a new fumonisin from *Fusarium moniliforme* grown in a liquid culture. – *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 3, 367 – 369.
43. MARASAS W.F., JASKIEWICZ K., VENTER F.S., VAN SCHALKWYK D.J. – *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. – *S. Afr. Med. J.*, 1988, **74**, 3, 110 – 114.
44. MARASAS W.F., KRIEK N.P., FINCHAM J.E., VAN RENSBURG S.J. – Primary liver cancer and oesophageal basal cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*. – *Int. J. Cancer.*, 1984, **34**, 3, 383 – 387.
45. MARIN S., MAGAN N., BELLI N. et al. – Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. – *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **51**, 159-167.
46. MARIN S., SANCHIS V., VINAS I., CANELA R., MAGAN N. – Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. – *Letters in Applied microbiology*, 1995, **21**, 298 – 301.
47. MARTINEZ-LARRANAGA M.R., ANADON A., DIAZ M.J. et al. – Induction of cytochrome P450 1A1 and P450 4A1 activities and peroxisomal proliferation by fumonisin B1. – *Toxicology and applied pharmacology*, 1996, **141**, 185 – 194.
48. MERRILL A.H., VAN ECHTEN G., WANG E., SANDHOFF K. – Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. – *The journal of biological chemistry*, 1993, **268**, 36, 27299 – 27306.

49. MOTELIN G.K., HASCHEK W.M., NESS D.K. et al. – Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. – *Mycopathologia*, 1994, **126**, 27 - 39.
50. MOTUT P. – La NADPH-cytochrome P450 réductase de canard : purification et immunoinhibition. – 112 p.- Thèse : Doct : Vet : Lyon, 1995.
51. MURRAY M., REIDY G.F. – Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P450 by chemical agents. – *Pharmacological reviews*, 1990, **42**, 2, 85 – 98.
52. NEBERT D.W., GELBOIN H.V. – Substrate inducible aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzymes. – *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 6242 – 6249.
53. NELSON D.R., KOYMANS L., KAMATAKI T. et al. – P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. – *Pharmacogenetics*, 1996, **6**, 1, 1 – 42.
54. NORRED W.P. – Fumonisins : mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. – *J. Toxicol. Environ. Health.*, 1993, **38**, 3, 309 – 328.
55. NORRED W.P., PLATTNER R.D, CHAMBERLAIN W.J. – Distribution and excretion of [14C] fumonisin B1 in male Sprague-Dawley rats. – *Nat. Toxins*, 1993, **1**, 6, 341 – 346.
56. NORRED W.P., VOSS K.A., BACON C.W., RILEY R.T. – Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. – *Fd. Chem. Toxicol.*, 1991, **29**, 19, 815 – 819.
57. OKEY A.B. – Enzyme induction in the cytochrome P450 system. – *Pharmac. Ther.*, 1990, **45**, 241 – 298.
58. OMURA T., SATO R. – A new cytochrome in liver microsomes. – *J. Biol. Chem.*, 1962, **237**, 1375 – 1376.

59. OSWEILER G.D., KEHRLI M.E., STABEL J.R. et al. – Effects of fumonisin contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. – *Journal of animal science*, 1993, **71**, 2, 459 – 466.
60. PAMPORI N.A., SHAPIRO B.H. – Sexual dimorphism in avian hepatic monooxygenases. – *Biochem. Pharmacol.*, 1993, **46**, 5, 885 – 890.
61. PEMONT J. – Enzymes – catalyseurs du monde vivant. – *Grenoble : presses universitaires*, 1995 , 400 – 402.
62. PLATTNER R.D., SHACKELFORD D.D. – Biosynthesis of labeled fumonisins in liquid cultures of *Fusarium moniliforme*. – *Mycopathologia*, 1992, **117**, 1 - 2, 17 – 22.
63. PRADE L., NEUEFEIND T., HUBER R. – Glutathione S-Transferase : molecular biological, biophysical, and crystallographical studies of different isoenzymes. – [http : // www-biochem.mpg.de/xray/projects/](http://www-biochem.mpg.de/xray/projects/), 19 avr. 1999.
64. QURESHI M.A., GARLICH J.D., HAGLER W.M., WEINSTOCK D. – *Fusarium proliferatum* culture material alters several production and immune performance parameters in White Leghorn chickens. - *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 1995, **17**, 4, 791 – 804.
65. RHEEDER J.P., MARASAS W.F., THIEL P.G. et al. – *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. – *Phytopathology* , 1992, **82**, 3, 353 – 357.
66. RILEY R.T., WANG E., SCHROEDER J.J. et al. – Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. – *Natural toxins*, 1996, **4**, 3 – 15.
67. RIVIERE J.L. – Hepatic microsomal monooxygenase activities in natural populations of the mallard duck *Anas Platyrhynchos*, the tufted duck *Aythya fuligula* and the great crested grebe *Podiceps cristatus*. – *Ecotoxicology*, 1992, **1**, 117 – 135.
68. RONIS M.J.J., HANSSON T., BORLAKOGLU J., WALKER C.H. – Cytochromes P450 of sea birds : cross-reactivity studies with purified rat cytochromes. – *Xenobiotica*, 1989, **19**, 10, 1167 – 1173.

69. SAUVIAT M.P., LAURENT D., KOHLER F., PELLEGRIN F. – Fumonisin, a toxin from the fungus *Fusarium moniliforme* shield, blocks both the calcium current and the mechanical activity in frog atrial muscle. – *Toxicon.*, 1991, **29**, 8, 1025 – 1031.
70. SCOTT P.M. – Fumonisins. – *Int. J. Food Microbiol.*, 1993, **18**, 4, 257 – 270.
71. SHEPHARD G.S., THIEL P.G., SYDENHAM E.W., ALBERTS J.F. – Biliary excretion of the micotoxin fumonisin B1 in rats. – *Fd. Chem. Toxic.*, 1994, **32**, 5, 489 – 491.
72. SHEPHARD G.S., THIEL P.G., SYDENHAM E.W., SAVARD M.E. – Fate of a single dose of 14C-labelled fumonisin B1 in vervet monkeys. – *Nat. Toxins.*, 1995, **3**, 3, 145 – 150.
73. SHEPHARD G.S., THIEL P.G., SYDENHAM E.W., VLEGGAAAR R., ALBERTS J. – Determination of the mycotoxin FB1 and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. – *Food Chem. Toxic.*, 1994, **32**, 1, 23 – 29.
74. SHEPHARD G.S., THIEL P.G., SYDENHAM E.W., ALBERTS J., CAWOOD M. – Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B1 in a non-human primate. – *Toxicon.*, 1994, **32**, 6, 735 – 741.
75. SHORT C.R., FLORY W., HSIEH L.C. et al. – Comparaison of hepatic drug metabolizing enzyme activities in several agricultural species. – *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, **91C**, 2, 419 – 424.
76. SNYDER M.J., MADDISON D.R. – Molecular phylogeny of glutathione S-Transferases. – *DNA Cell. Biol.*, 1997, **16**, 11, 1373 – 1384.
77. SPIEGEL S., MERRILL A.H. – Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. – *FASER J.*, 1996, **10**, 1388 – 1397.
78. SUZUKI C.A.M., HIERLIHY L., BARKER M. et al. – The effects of fumonisin B1 on several markers of nephrotoxicity in rats. – *Toxicology and applied pharmacology*, 1995, **133**, 207 – 214.

79. SYDENHAM E., STOCKENSTROM S., THIEL P. et al. – Fumonisin-contaminated maize : physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. – *Food additives and contaminants*, 1994, **11**, 1, 25 – 32.
80. TESTA B., JENNER P. – Inhibitors of cytochrome P450 and their mechanism of action. – *Drug metabolism reviews*, 1981, **12**, 1, 1 – 117.
81. THIBAULT N. – Les fumonisines : nature, origine et toxicité - 136 p – Thèse : Doct. : Vet. : Toulouse, 1997.
82. TIMBRELL J.A. – Biotransformation of xenobiotics. – In : BALLANTYNE B., MARSS T., TURNER P. – *General and applied toxicology* – New York : Abridged Edition, 1985, Chap 3, 79 – 96.
83. VAN DER WESTHUIZEN L., SHEPHARD G.S., SNYMAN S.D. et al. – Inhibition of sphingolipid biosynthesis in rat primary hepatocyte cultures by fumonisin B1 and other structurally related compounds. – *Food Chem. Toxicol.*, 1998, **36**, 6, 497 – 503.
84. VAN DER WESTHUIZEN L., SHEPHARD G.S., VAN SCHALKWYK D.J. – The effect of a single gavage dose of fumonisin B1 on the sphinganine and sphingosine levels in vervet monkeys. – *Toxicology*, 2000, **39**, 273 – 281.
85. VESONDER R.F., WU W. – Correlation of moniliformin, but not fumonisin B1 levels, in culture materials of Fusarium isolates to acute death in ducklings. – *Poultry science*, 1998, **77**, 67 – 72.
86. VOSS K.A., CHAMBERLAIN W.J., BACON C.W., RILEY R.T., NORRED W.P. – Subchronic toxicity of fumonisin B1 to male and female rats. – *Food additives and contaminants*, 1995, **12**, 3, 473 – 478.
87. VOSS K.A., RILEY R.T., BACON C.W. et al. – Subchronic toxic effects of *Fusarium moniliforme* and fumonisin B1 in rats and mice. – *Natural toxins*, 1996, **4**, 16 – 23.
88. VUDATHALA D.K., PRELUSKY D.B., AYROUD M., TRENHOLM H.L., MILLER J.D. – Pharmacokinetic fate and pathological effects of 14C-fumonisin B1 in laying hens. – *Natural toxins*, 1994, **2**, 2, 81 – 88.

89. WALKER C.H. – Avian forms of cytochrome P450. - *comparative biochemistry and physiologie*, 1998, **121C**, 65 – 72.
90. WALKER C.H., RONIS M.J.J. – The monooxygenases of birds, reptiles and amphibians. – *Xenobiotica*, 1989, **19**, 10, 1111 – 1121.
91. WANG E., NORRED W.P., BACON C.W., RILEY R.T., MERRILL A.H. – Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. – *The journal of biological chemistry*, 1991, **266**, 22, 14486 – 14490.
92. WANG H., WEI H., MA J., LUO W. – The fumonisin B1 content in corn from north China, a high-risk area of oesophageal cancer. – *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000, **19**, 139 – 141.
93. YOO H.S., NORRED W.P., WANG E., MERRILL A.H., RILEY R.T. – Fumonisin inhibition of *de novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. – *Toxicology and applied pharmacology*, 1992, **114**, 9 – 15.