

# TOXICOCINETIQUE DE LA FUMONISINE B1 CHEZ LE CANARD

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2005  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Caroline, Anny BLUTEAU**  
Née, le 25 avril 1980 à EVREUX (Eure)

---

**Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Philippe GUERRE**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Gérard CAMPISTRON**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**M. Philippe GUERRE**  
**M. Jean-Denis BAILLY**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**M. Didier TARDIEU**

Docteur de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE

**TOULOUSE 2005**

**NOM : BLUTEAU**

**PRENOM : CAROLINE**

**TITRE : Toxicocinétique de la fumonisine B1 chez le canard.**

La fumonisine B1 est une mycotoxine produite par *Fusarium verticillioides* fréquemment retrouvée sur le maïs. Responsable de diverses pathologies, dont l'apparition de cancer, chez les animaux, elle semble être corrélée à une forte prévalence du cancer de l'oesophage chez l'homme. Le canard mulard peut absorber près d'1 kg de maïs par jour en phase de gavage et être vecteur de résidus. Aucune donnée n'est, à l'heure actuelle, disponible sur la cinétique de la FB1 dans cette espèce. Ce travail présente le devenir de la FB1 chez le canard en croissance après administration intra-péritonéale et orale. Ces travaux révèlent une biodisponibilité moyenne de 3% après administration orale et une demi-vie d'élimination voisine de 1 heure. Ces résultats sont en accord avec ceux déjà publiés chez les autres espèces monogastriques.

**MOTS CLES : toxicocinétique - fumonisine B1 (FB1) – canard - résidus**

---

**TITLE : Toxicokinetics of fumonisin B1 in ducks.**

Fumonisin B1 (FB1) is a mycotoxin produced by *Fusarium verticillioides*, frequently present on cultivated corn. In animals it is responsible for a number of pathologies including cancer. Evidence suggests that amongst men an association exists between FB1 and the prevalence of oesophagus cancer. During the force-feeding phase, the Mulard duck typically swallows two pounds of corn per day and could be a vector for residues. No data is currently available about the kinetics of FB1 of this species. The present thesis consequently presents the fate of FB1 in growing ducks after intraperitoneal and oral administration. Several parameters for this kinetics were established: bioavailability after intra-peritoneal administration (3%) half-life time elimination after oral administration (1 hour). Present findings were consistent with previous research based on monogastric species.

**KEY WORDS : toxicokinetics - fumonisin B1 (FB1) – duck - residues**

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	P. DESNOYERS
Directeurs honoraires.....	: M.	R. FLORIO
	M.	J. FERNEY
	M.	G. VAN HAVERBEKE
Professeurs honoraires.....	: M.	A. BRIZARD
	M.	L. FALIU
	M.	C. LABIE
	M.	C. PAVAU
	M.	F. LESCURE
	M.	A. RICO
	M.	A. CAZIEUX
	Mme	V. BURGAT
	M.	D. GRIESS
	M.	J. CHANTAL
	M.	J.-F. GUELFY
	M.	M. EECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

---

M.	CABANIE Paul, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i>
M.	DARRE Roland, <i>Productions animales</i>
M.	DORCHIES Philippe, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	TOUTAIN Pierre-Louis, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>

PROFESSEURS 1<sup>ère</sup> CLASSE

---

M.	AUTEFAGE André, <i>Pathologie chirurgicale</i>
M.	BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	BRAUN Jean-Pierre, <i>Physique et Chimie biologiques et médicales</i>
M.	DELVERDIER Maxence, <i>Histologie, Anatomie pathologique</i>
M.	EUZEBY Jean, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	FRANC Michel, <i>Parasitologie et Maladies Parasitaires</i>
M.	MARTINEAU Guy-Pierre, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>
M.	MILON Alain, <i>Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie</i>
M.	PETIT Claude, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
M.	REGNIER Alain, <i>Physiopathologie oculaire</i>
M.	SAUTET Jean, <i>Anatomie</i>
M.	SHELCHER François, <i>Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour</i>

PROFESSEURS 2<sup>e</sup> CLASSE

---

Mme	BENARD Geneviève, <i>Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale</i>
M.	BERTHELOT Xavier, <i>Pathologie de la Reproduction</i>
M.	CONCORDET Didier, <i>Mathématiques, Statistiques, Modélisation</i>
M.	CORPET Denis, <i>Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires</i>
M.	DUCOS Alain, <i>Zootechne</i>
M.	DUCOS DE LAHITTE Jacques, <i>Parasitologie et Maladies parasitaires</i>
M.	ENJALBERT Francis, <i>Alimentation</i>
M.	GUERRE Philippe, <i>Pharmacie et Toxicologie</i>
Mme	KOLF-CLAUW Martine, <i>Pharmacie -Toxicologie</i>
M.	LEFEBVRE Hervé, <i>Physiologie et Thérapeutique</i>
M.	LIGNEREUX Yves, <i>Anatomie</i>
M.	PICAVET Dominique, <i>Pathologie infectieuse</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

---

M.	HENROTEAUX Marc, <i>Médecine des carnivores</i>
----	---

INGENIEUR DE RECHERCHES

---

M.	TAMZALI Youssef, <i>Responsable Clinique équine</i>
----	---

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

---

Mme	MICHAUD Françoise, <i>Professeur d'Anglais</i>
M.	SEVERAC Benoît, <i>Professeur d'Anglais</i>

---

**MAÎTRE DE CONFERENCES HORS CLASSE**

---

M. JOUGLAR Jean-Yves, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

---

**MAÎTRE DE CONFERENCES CLASSE NORMALE**

---

M. ASIMUS Erik, *Pathologie chirurgicale*  
M. BAILLY Jean-Denis, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. BERGONIER Dominique, *Pathologie de la Reproduction*  
M. BERTAGNOLI Stéphane, *Pathologie infectieuse*  
Mme BOUCRAUT-BARALON Corine, *Pathologie infectieuse*  
Mlle BOULLIER Séverine, *Immunologie générale et médicale*  
Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. BOUSQUET-MELOU Alain, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme BRET-BENNIS Lydie, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. BRUGERE Hubert, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle CADIERGUES Marie-Christine, *Dermatologie*  
Mme CAMUS-BOUCLAINVILLE Christelle, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme COLLARD-MEYNAUD Patricia, *Pathologie chirurgicale*  
Mlle DIQUELOU Armelle, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. DOSSIN Olivier, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. FOUCRAS Gilles, *Pathologie du bétail*  
Mme GAYRARD-TROY Véronique, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*  
M. GUERIN Jean-Luc, *Productions animales*  
Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*  
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*  
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. MAREnda Marc, *Pathologie de la reproduction*  
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*  
Mme MESSUD-PETIT Frédérique, *Pathologie infectieuse*  
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*  
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*  
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*  
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*  
M. SANS Pierre, *Productions animales*  
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

---

**MAÎTRE DE CONFERENCES CONTRACTUELS**

---

M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*  
N. DESMAIZIERES Louis-Marie, *Clinique équine*  
M. LEON Olivier, *Elevage et santé en productions avicoles et porcines*

---

**MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE**

---

M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

---

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

---

M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*  
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*  
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*  
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*

## REMERCIEMENTS

### ***A notre président de thèse***

#### **Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON**

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

*Physiologie – Hématologie*

Ayant fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,  
Hommages respectueux.

### ***A notre jury***

#### **Monsieur le Docteur Philippe GUERRE**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pharmacie et Toxicologie*

Qui a eu l'amabilité d'encadrer notre travail, avec une immense disponibilité et efficacité.

En témoignage de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

#### **Monsieur le docteur Jean-Denis BAILLY**

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Très sincères remerciements.

#### **Monsieur le docteur Didier TARDIEU**

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Toulouse

En hommage à sa gentillesse, sa sympathie et son efficacité à encadrer notre travail.

Très sincères remerciements.

***A mes parents.***

Il est biologiquement établi que je n'existerais pas sans eux, ça c'est sûr ! Mais je les remercie surtout de m'avoir aidé, chacun à leur manière, à arriver jusque là. Papa overbook mais là quand il faut, et Maman... toujours là (et ce n'est pas un reproche)! Ils sont un homme et une femme d'exception pour qui le don de soi envers leurs enfants est une priorité.

Je les remercie d'être simplement ce qu'ils sont, de l'exemple qu'il me donnent et ce qu'ils m'ont permis d'être.

***A mon frère : ce Géant.***

L'intelligence, la générosité et le caractère aussi, font de lui un Grand. Sa taille n'est qu'un détail. Tu as tracé devant moi un superbe exemple de combativité et de travail. Je suis fière de t'avoir suivi, et je suis fière de toi. Tu as le bonheur d'être merveilleusement accompagné (bientôt marié ?) par le meilleur prof. de français que je connaisse. Que dire de plus, sinon qu'il est bon d'être ta petite sœur.

***A Fanny*** : tu n'es pas mal non plus et merci de le supporter !

***A Anne-Marie, Jeannine, Michèle et Henri***, mes grands parents et ma tante,

Pour leur générosité, leur patience et leur foi en moi. Et merci de m'avoir permis de découvrir le monde.

***A pépé René***,

Nous n'avons pas eu le temps de nous connaître très bien, mais je suis sûre que tu serais fier de moi.

**A Pascale,**

Tu es comme une sœur pour moi. Rien n'aurait été pareil sans toi !

**A Mimine, Wolff, Carole, Nono, Fab, Manue, Blanche, Cath, Annie et Jr, Nathalie et Guigui et Blandine et Arnaud,**

Pour tous ces bons moments, ces soirées...et aussi ces coups de gueule !  
Une vraie petite famille merci pour tout !

**A tous les autres toulousains,** sans pouvoir les citer, quelle belle ambiance dans la plus belle école !

**A Lulu et Colette,**

Qu'est-ce qu'on ferait sans vous !

**A Didier et Trung,**

Pour le bonheur que c'est de travailler avec eux ; enfin, pas seulement, boire le café, aller au resto, refaire le monde, apprendre le français, plaisanter et, parfois travailler ! Merci pour tout...

**A Claudine,** merci pour ce sourire et cette part de féminité dans ce monde de brutes !

**A Patrice et Arnaud,**

Pour tous les bons moments et pour me faire me sentir encore du coin quand je reviens sur le Bassin.

**A Caro,**

Même si ces dernières années nous ont un peu éloignées, tu es une amie.

**A Emilie,**

Toujours fidèle à toi-même et aux autres, à quand le mariage pour que je sois témoin !

**Aux Docteurs Do Chi et toute l'équipe qui les entoure,**

Pour m'avoir fait découvrir la passion de notre métier et pour m'aider à l'appivoiser.

**A ma grosse, Pandora,**

Pour sa beauté, sa gentillesse et sa grande taille. Pour les heures passées à m'attendre sans rien détruire, sauf mes relations de voisinage, pour sa dévotion à sauver ses congénères et à m'apprendre l'anatomie pour les examens, enfin pour ses 65kg de bonheur.

Et à tous ses copains : Bonnie, Œdipe, Orphée, Pepper, Pottok, Rangoon, Shaggy, Tweety, et aux chats Poupig, Triskèle et Chatoune, pour l'avoir acceptée telle qu'elle est : énorme !

### ***A ma Golf,***

Elle aurait dû tenir jusqu'à ma sortie de l'école, elle n'a pas respecté le contrat : elle est le maillon faible. Elle était quand même près du but...



## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	5
TABLE DES MATIÈRES.....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS .....	12
INTRODUCTION .....	13
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
<b>I./ FUMONISINE B1, PRODUCTION PROPRIÉTÉS ET DOSAGE .....</b>	<b>14</b>
I .1./ <i>Fusarium verticilloides</i> .....	14
I.1.1./ Ecologie.....	14
I.1.2./ Croissance .....	15
I.1.3./ Toxinogénèse .....	15
I.2./ Fumonisine B1 .....	16
I.2.1./ Structure .....	16
I.2.2./ Propriétés .....	17
I.2.3./ Stabilité.....	18
I.2.4./ Techniques d'analyse .....	19
<b>II./ MYCOTOXICOSES ET ACTION CELLULAIRE .....</b>	<b>22</b>
II.1./ Espèces très sensibles .....	22
II.1.1./ Equidés .....	22
II.1.2./ Suidés .....	24
II.2./ Espèces peu sensibles .....	25
II.2.1./ Ruminants .....	25
II.2.2./ Volailles .....	26
II.2.3./ Primates non humains.....	27
II.3./ Pouvoir carcinogène .....	27
II.3.1./ Rongeurs.....	27
II.3.2./ Humains .....	28
II.4./ Action cellulaire .....	29
II.4.1./ Altération du métabolisme des sphingolipides.....	29
II.4.2./ Cytotoxicité et toxicité aiguë .....	30
II.4.3./ Pouvoir mutagène et cancérogénèse .....	31
III.2.1./ Absorption .....	32
III.2.2./ Distribution .....	34
III.2.3./ Métabolisme .....	35
III.2.4./ Élimination .....	36
<b>I./ MATÉRIEL ET MÉTHODE.....</b>	<b>39</b>
I.1./ Matériel .....	39
I.2./ Animaux.....	40
I.3./ Dosage de la FB1 .....	41
I.3.1./ Méthode d'extraction .....	41
I.3.2./ Dosage .....	42
<b>II./ RÉSULTATS .....</b>	<b>43</b>
II.1./ Validation .....	43
II.1.1./ Linéarité.....	43
II.1.2./ Fidélité : Répétabilité (r) et Reproductibilité (R).....	44
II.1.3./ Pourcentages d'extraction .....	45
II.2./ Cinétiques .....	45
II.2.1./ Administration intra-péritonéale (IP) .....	45

II.2.2./ Administration par voie orale (VO).....	47
II.2.3./ Modélisation .....	48
<b>III./ DISCUSSION .....</b>	<b>49</b>
III.1./ Protocoles .....	49
III.2./ Validation de la méthode.....	49
III.3./ Absorption de la FB1.....	49
III.4./ Distribution de la FB1 .....	51
III.5./ Elimination et modélisation .....	52
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>54</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 FORMULE PLANE DE LA FB1 .....	17
TABLEAU 1 FORMULES DES FUMONISINES .....	17
FIGURE 2 VOIE DE BIOSYNTHESE DES SPHINGOLIPIDES ET EFFETS DE LA FB1 (NORRED 93 J. TOX. ENV. HEALTH ).....	29
FIGURE 3 CONCENTRATION PLASMATIQUE EN FB1 EN FONCTION DU TEMPS APRES INJECTION INTRA-PERITONEALE [73]. .....	32
FIGURE 4 CONCENTRATION PLASMATIQUE EN FB1 EN FONCTION DU TEMPS APRES ADMINISTRATION IV (2MG/KG) ET VO (10MG/KG) [54].....	32
TABLEAU 2 ABSORPTION DE LA FB1 (ET FB2 CHEZ LE SINGE). .....	33
TABLEAU 3 DISTRIBUTION ET EXCRETION DE LA FB1. ....	34
FIGURE 5 REPRESENTATION SEMI-LOGARITHMIQUE DE LA PHASE D'ELIMINATION DE LA FB1 APRES ADMINISTRATION INTRA-PERITONEALE [73]. .....	37
FIGURE 6 REPRESENTATION SEMI-LOGARITHMIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES EN FB1 DE DEUX ANIMAUX APRES ADMINISTRATION IV [67]. .....	37
TABLEAU 4 MODELISATION DE LA TOXICOCINETIQUE DE LA FB1 (ET FB2). .....	38
FIGURE 7 METHODE D'EXTRACTION DE LA FB1 DANS LE SERUM ET LES TISSUS .....	41
FIGURE 8 REPOSE DU DETECTEUR EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN FB1- DROITE DE REGRESSION ET COEFFICIENT DE CORRELATION. ....	44
TABLEAU 5 ETUDE DU FACTEUR DE REPOSE SUR LA GAMME DE STANDARDS UTILISEE. ....	44
TABLEAU 6 REPETABILITE D'UN MEME ECHANTILLON A 0,25µG/ML DE FB1. ....	44
TABLEAU 7 REPRODUCTIBILITE D'UN ECHANTILLON A 0,1µG/ML DE FB1. ....	44
FIGURE 9 CINETIQUE SERIQUE MOYENNE DE LA FB1 APRES ADMINISTRATION DE 10MG/KG PAR VOIE INTRA-PERITONEALE. A : CANARDS ADULTES (2KG PV) ; B : CANETONS (0,25KG PV) .....	46
FIGURE 10 CINETIQUE TISSULAIRE MOYENNE DE LA FB1 APRES ADMINISTRATION DE 10 MG/KG PAR VOIE INTRA-PERITONEALE A DES CANETONS (0,25KG). A : FOIES ; B : MUSCLES. ....	46
FIGURE 11 CINETIQUE DE LA FB1 DANS LE SERUM DES CANARDS MAIGRES ADULTES APRES ADMINISTRATION D'UNE DOSE DE FB1 DE 160MG/KG PAR VOIE ORALE.....	47
FIGURE 12 REPRESENTATION, EN ECHELLE SEMI-LOGARITHMIQUE, DE LA CINETIQUE PLASMATIQUE DE FB1 APRES ADMINISTRATION INTRA-PERITONEALE DE FB1 (10MG/KG). A : CANARDS ADULTES (2KG) ; B : CANETONS (0,25KG). .....	48
TABLEAU 8 ABSORPTION DE LA FB1. ....	50
TABLEAU 9 DISTRIBUTION TISSULAIRE DE FB1. ....	51
TABLEAU 10 TEMPS DE DEMI-ELIMINATION DE LA FB1 . ....	52

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACN : Acétonitrile	IP: Intra-péritonéal
AFNOR : Agence Française de NORmalisation	IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
ALAT : Alanine amino-transférase	IV : Intra-veineux
ASAT : Aspartate amino-transférase	KCl : Chlorure de potassium
CaCo : Lignée cellulaire de cancer du colon humain	LDH : Lactate déshydrogénase
CCM : Chromatographie sur Couches Minces	LLC-PK1 : Cellules épithéliales de rein de porc
CG : Chromatographie Gazeuse	MeOH : Méthanol
Cu : Curie	OPA : Ortho-phthaldialdéhyde
CV : Coefficient de Variation	PAL: Phosphatases Alcalines
EDTA : Ethylène Diamine Tetraacetic Acid	PCR : Polymerase chain reaction
ELEM : Leucoencéphalomalacie équine	pH : Potentiel hydrogène
ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	PKC : Phosphokinase C
EtOH : Ethanol	PPE : Œdème pulmonaire porcin
FB1 : Fumonisine B1	PV : Poids vif
FB2 : Fumonisine B2	Sa : Sphinganine
GGT: Gamma Glutamyl Transférase	SAX : Strong Anion Exchange
H : heure	So : Sphingosine
HFB1 : Hydroxy-FB1	TG : Triglycérides
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression	UV : Ultra-violet
IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer	VO : Voie orale
	XAD-2 : nonionic polystyrene divinylbenzene resin
	<sup>14</sup> C-FB1: FB1 marquée au Carbone14

## INTRODUCTION

Les mycotoxicoses sont des maladies dues à l'ingestion de mycotoxines contenues dans un aliment. Elles sont à l'heure actuelle encore souvent mal connues.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires pouvant être sécrétés par diverses moisissures sur plusieurs produits agricoles dans certaines conditions environnementales [2]. On estime qu'au moins 25% des grains produits chaque année dans le monde sont contaminés par des mycotoxines. La Fumonisine B1 est l'une de ces toxines. Elle est synthétisée essentiellement par le genre *Fusarium* et particulièrement par *F. verticilloides*. La Fumonisine B1 se trouve principalement sur le maïs, qui représente un composant très utilisé dans l'alimentation animale et humaine.

L'ingestion de Fumonisines est très fréquente, car ces toxines sont présentes dans le monde entier et la fréquence de contamination est très élevée. Elles sont responsables de maladies graves chez les équidés et les suidés, semblent représenter un danger pour l'homme, mais ne provoquent a priori que de légères modifications hépatiques chez les espèces qui n'y sont que très peu sensibles [1].

Les palmipèdes sont peu sensibles à l'intoxication aux fumonisines. L'élevage de canards gras, reposant sur l'ingestion d'une grande quantité de maïs lors du gavage des animaux (1kg/jour), pourrait représenter un vecteur pour l'ingestion de Fumonisine B1 par l'Homme. L'objet de notre étude est de définir la cinétique de la FB1 chez ces animaux.

## PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I./ FUMONISINE B1, PRODUCTION PROPRIÉTÉS ET DOSAGE

#### I.1./ *Fusarium verticilloides*

*Fusarium verticilloides* Sheldon est le principal producteur de fumonisines. Nous aborderons sa description, ses conditions de croissance et celles de sa toxinogénèse.

##### I.1.1./ Ecologie

*Fusarium verticilloides* est une moisissure mondialement représentée, que le climat soit chaud, humide ou tempéré. Isolé sur des cultures de maïs essentiellement, il parasite aussi le sorgho, le riz, le millet et la canne à sucre. Outre les cultures sur pieds, il parasite aussi les récoltes et les résidus végétaux du sol [90].

La contamination des plants est multifactorielle : elle peut être endogène ou exogène. La contamination endogène est due à celle des semences, l'exogène à une contamination tellurique ou animale (blessures du grain par des insectes) [1] ; cette dernière peut débiter sur toute zone du végétal et la dissémination peut s'effectuer en surface ou atteindre les vaisseaux et progresser dans toute la plante [71].

Un pied de maïs infecté peut paraître sain (en effet certaines infestations sont silencieuses) mais il n'est pas rare de remarquer de graves dommages comme le pourrissement du plant ou de l'épi. On note un feutrage mycélien blanc à rosé sur l'épi et des taches de nécrose noirâtres sur toutes les zones aériennes. La croissance de la moisissure et la synthèse de la toxine sont possibles à tous les stades d'évolution de la plante, mais la période correspondant au développement maximal est la péri récolte [23].

### I.1.2./ Croissance

Lors d'études sur la croissance de la moisissure, trois paramètres sont pris en compte : la température, le confinement et l'humidité.

*Fusarium verticilloides* est thermotolérant, il peut croître dans un intervalle de température compris entre 5°C et 40°C, mais la température optimale de croissance est de 25-30°C et on n'observe aucune croissance à plus de 40°C [53].

Cependant la moisissure se développe très mal en atmosphère confinée, en atmosphère modifiée (N<sub>2</sub> et/ou CO<sub>2</sub>), au cœur des ensilages par exemple.

La croissance optimale du champignon nécessite une teneur en eau supérieure à 22% et une activité hydrique supérieure à 0,9. Le développement ne devrait donc pas être possible lors du stockage, si le séchage et la conservation sont corrects [52]. Le pH optimal est de 7,0 à 30°C [53].

### I.1.3./ Toxinogénèse

*Fusarium verticilloides* sécrète plusieurs toxines (Fumonisines, Fusarine C, moniliformine) mais nous ne considérons ici que la synthèse des Fumonisines. Les voies de synthèse sont encore mal connues, mais les facteurs de variation de cette synthèse sont nombreux.

La sécrétion de toxine dépend de l'espèce et de la souche de la moisissure. En effet, la Fumonisine B1 est produite par plusieurs genres de moisissures mais le principal est le genre *Fusarium*. Au sein même de ce genre, de nombreuses espèces sécrètent la toxine en quantités très variables, mais les espèces appartenant à la section Liseola sont les plus fortes productrices, excepté *F. subglutinans*, et, quelle que soit la souche, *F. verticilloides* est le plus fort producteur. Certaines espèces de *Fusarium* synthétisant la Fumonisine ne sont pas ou peu associées aux cultures de maïs mais parasitent le sorgho ou le millet, tout aussi importants en alimentation (*F. napiforme* et *F. nygamai*) [59]. La Fumonisine B1 est la plus synthétisée, suivie par la FB2.

Lors d'une étude dans le sud-ouest de la France, 73 souches de *Fusarium verticilloides* ont été isolées ; et toutes produisaient de la FB1 mais à des taux très variables [45]. De fortes concentrations en FB1 ont été retrouvées dans le maïs de

régions d'Afrique du Sud et de Chine. En Europe, sur 256 échantillons analysés, 199 contenaient de la FB1 à des concentrations allant de 0,01 à 250 mg/kg [90].

La toxinogénèse dépend également des conditions du milieu, telles que la nature du substrat, la température, l'activité hydrique, la teneur en eau, et le confinement. Le maïs est de loin le meilleur substrat pour la synthèse de Fumonisines devant le riz ou le soja [23].

Alors que la moisissure se développe à 35°C, la toxine n'est plus produite à cette température. La température optimale de production est de 20°C, mais elle débute dès 4°C [38, 52].

La production de la toxine nécessite une activité hydrique supérieure à celle nécessaire à la croissance du champignon. En effet elle est divisée par 3 lorsque l'activité hydrique passe de 1 à 0,95, et par 300 quand elle passe de 1 à 0,9. La teneur en eau doit être de 32% pour que la production de toxine soit maximale [11].

La synthèse de FB1 commence dès la deuxième semaine de croissance de *F. verticilloides*, augmente pendant sa phase stationnaire et diminue après 13 semaines [23].

Comme pour la croissance, la toxinogénèse est inhibée dans des conditions de confinement, de stockage en atmosphère modifiée (N<sub>2</sub> et/ou CO<sub>2</sub>) ou en ensilage, et au cours des processus de fermentation [52].

## I.2./ Fumonisine B1

Les fumonisines sont de découverte relativement récente (1988) [7]. Elles sont devenues un objet d'étude important. Deux d'entre elles (FB1 et FB2) sont reconnues responsables de diverses pathologies liées à la consommation de maïs, ou d'aliments à base de maïs, contaminés. Nous allons aborder successivement la structure, les propriétés, la stabilité et les techniques d'analyse des fumonisines en nous intéressant plus particulièrement à la FB1, la plus abondante et la plus toxique.

### I.2.1./ Structure

La structure de la FB1 a été découverte en 1988 par résonance magnétique nucléaire et spectrométrie de masse. C'est un diester de l'acide 1,2,3-propan-



tricarboxylique et du 2-amino-12,16-diméthyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyeicosane [24].

La structure de base est une longue chaîne carbonée hydroxylée présentant des groupes méthyles et un groupe amine primaire. Deux des groupes hydroxyles sont estérifiés par deux acides propane-1,2,3-tricarboxyliques (figure 1). La chaîne hydrocarbonée possède 10 centres chiraux de configuration 2S, 3S, 5R, 10R, 12S, 14S, 15R, 16R ; la stéréochimie des acides tricarboxyliques est de configuration R [4,26].

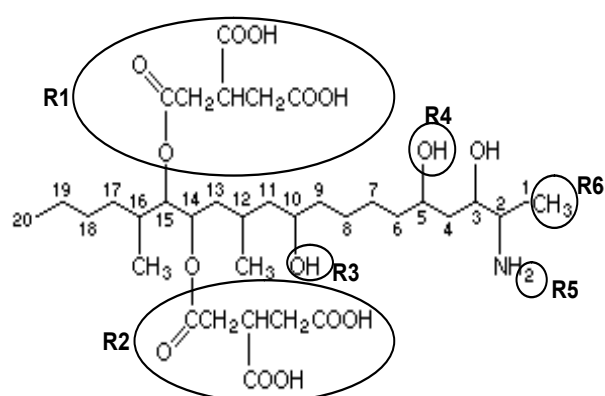


Figure 1 Formule plane de la FB1

Tableau 1 Formules des fumonisines

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
FB1	TCA	TCA	OH	OH	H	CH3
FB2	TCA	TCA	H	OH	H	CH3
FB3	TCA	TCA	OH	H	H	CH3
FB4	TCA	TCA	H	H	H	CH3
FC1	TCA	TCA	OH	OH	H	H
FC2	TCA	TCA	H	OH	H	H
FC3	TCA	TCA	OH	H	H	H
FC4	TCA	TCA	H	H	H	H
AP1	OH	H	OH	OH	H	CH3

TCA= acide tricarboxylique

## I.2.2./ Propriétés

### I.2.2.1./ Propriétés physiques

La FB1 se présente sous forme d'un solide, de poids moléculaire 722g/mol dont le point de fusion est compris entre 103°C et 105°C [23]. C'est un composé polaire, soluble dans l'eau et plus soluble encore dans le méthanol et le mélange acétonitrile-eau. Elle est insoluble dans les solvants apolaires [89,24].

La FB1 n'absorbe ni dans des longueurs d'ondes de lumière visible ni dans celles de lumière ultra-violette, elle n'est pas fluorescente. Elle peut être mise en évidence par chromatographie couplée à une détection de fluorescence ( $\lambda_{ex}$  335nm,  $\lambda_{em}$  440nm) après dérivation par l'ortho-phthalaldéhyde ou par spectroscopie de

masse. Le spectre infrarouge révèle des absorptions maximales à 3450, 2934, 1729, 1632  $\text{cm}^{-1}$  [72].

#### 1.2.2.2./ Propriétés chimiques

La structure d'ester permet l'hydrolyse par chauffage en milieu acide ou basique qui libère les acides propane tricarboxylique et un aminopolyol [89].

La fonction amine primaire et les fonctions alcool permettent la N et/ou O acétylation ou méthylation. La réaction de dérivation précitée s'effectue sur la fonction amine primaire. L'extraction par le méthanol produit des dérivés méthylés qui peuvent interférer avec l'analyse chromatographique [71].

La configuration spatiale de la fonction amine et des acides carboxyliques suggère un éventuel pouvoir chélateur [24].

#### 1.2.3./ Stabilité

La stabilité de la FB1 face aux effets de la chaleur, d'un traitement chimique, du tamisage, de la fermentation alcoolique et du vieillissement, a été étudiée en vue de l'éliminer des aliments contaminés [23].

La concentration en FB1 d'un aliment contaminé traité par chaleur sèche décroît avec le temps et l'augmentation de température. Cependant, la FB1 est considérée comme thermostable car le temps de demi-vie est encore de 10 minutes à 150°C. Lors d'une cuisson dans de l'eau bouillante, la FB1 est transférée progressivement dans l'eau de cuisson et également en partie détruite [1].

Des traitements chimiques ont également été étudiés. L'ammoniation (2% d'ammoniaque à 50°C sous pression atmosphérique) diminue les teneurs en FB1 mais ne semble pas annihiler l'effet toxique [90]. Le traitement à l'eau chaudière ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$  24heures à 25°C) entraîne la perte de la structure contenant le plus de toxine : le péricarpe du grain ; et diminue de 95% la toxicité du maïs.

Les particules fines de maïs (<3mm) concentrent entre 26,2 et 69,4% de la FB1, ainsi les techniques de tamisage pourraient représenter une première étape de décontamination [2].

La fermentation alcoolique est intéressante puisque l'éthanol détruit partiellement la FB1 et que la fraction subsistante ne se retrouve pas dans la phase

alcoolique. Cependant l'utilisation du maïs en brasserie doit être contrôlée car la destruction de la FB1 n'est pas totale lors du processus de fermentation [2].

En solution, la FB1 conservée à -18, 4 ou 25°C est stable 6 semaines dans un mélange acétonitrile-eau (1-1) alors que dans le méthanol elle n'est stable qu'à -18°C [88].

#### I.2.4./ Techniques d'analyse

Les techniques d'analyse sont fondées sur la polarité et la solubilité de la FB1. Les étapes de l'analyse sont l'extraction, la purification et la quantification.

##### I.2.4.1./ Extraction

Pour les échantillons solides, l'extraction nécessite une phase de broyage (Plytron homogenizer) [84] et d'homogénéisation dans le solvant d'extraction constitué généralement par un mélange acétonitrile-eau (1-1) [69] ou de méthanol-eau (3-1) [84,79]. La solution résultant de cette première étape est ensuite décantée ou centrifugée (500g à 4°C) et le surnageant récupéré et filtré (Wathman numéro 4). Le pH est ajusté à l'aide de solutions tampon (pH compris entre 5,8 et 6,5) [84].

Pour les échantillons liquides (plasma, urine ou milieu de culture liquide), la phase d'extraction n'est pas nécessaire : la purification est effectuée directement à partir de l'échantillon [74].

##### I.2.4.2./ Purification

Elle peut être réalisée par passage de l'extrait sur une phase solide (colonne échangeuse d'anion ou silice greffée) [79]. La colonne échangeuse d'anion est conditionnée par des lavages successifs (5ml de méthanol puis 5ml de méthanol-eau (3-1)), l'extrait est déposé et la FB1 va être retenue par la phase solide stationnaire. La colonne est ensuite lavée, puis éluée. Le passage de l'éluant permet de détacher la FB1 et de la récupérer en phase liquide à la sortie de la colonne. Le produit de l'éluion est ensuite évaporé sous courant d'azote [84]. Compte tenu du caractère acide de la FB1, le pH du soluté doit être compris entre 5,8 et 6,5, pour qu'elle soit

ionisée [24]. D'autre part l'éluant doit être polaire et acide afin de déplacer l'équilibre réalisé entre la FB1 et la phase stationnaire. Certains préconisent l'utilisation d'une solution d'acide acétique à 0,5% dans du méthanol, d'autres obtiennent de meilleurs résultats avec une solution à 1%. La vitesse de dépôt du soluté (proposée à 2ml/min) n'est pas un facteur de variation de la purification. La vitesse d'éluion doit être inférieure à 1ml/min [84]. En effet, plus la vitesse augmente et moins la collecte est importante.

On note que pour l'urine un passage successif sur deux colonnes est nécessaire : d'abord sur XAD-2 puis sur SAX ceci permettant de ne pas diluer l'urine [64].

La méthode utilisant la silice greffée ([69] Rottinghaus *et al.* 1992) est beaucoup moins utilisée car entraînant une moins bonne séparation de la FB1 que la colonne échangeuse d'anion (Stockenstrom *et al.* 1994) [24].

Un autre type de colonne de purification, plus récente, permet l'isolement de la FB1 ; son principe réside dans l'immunoaffinité. Il donne de très bons résultats mais est plus coûteux [22].

#### I.2.4.3./ Quantification

Les techniques de quantification de la FB1 reposent sur les différents types de chromatographie (sur couche mince CCM, en phase gazeuse GC, ou liquide LC et HPLC).

La CCM a été la première technique utilisée pour la quantification de la FB1. La limite de détection est élevée (51,1ng pour les solutions standards et 100ng pour les extraits de maïs). La phase fixe est un gel de silice ou une phase greffée C18. La migration est permise par une phase liquide constituée respectivement d'un mélange de chloroforme-eau-acide acétique (6:3:1) ou de méthanol-KCl aqueux 4% (3:2). La détection est réalisée après vaporisation de p-anisaldéhyde ou de ninhydrine pour les gels de silice et de tampon borate puis fluorescamine puis acide borique pour les phases greffées C18. Les plaques sont séchées puis examinées sous lumière UV [69, 24,79].

La CG utilise le N2 ou l'Argon comme phase gazeuse. La limite de détection est de 0,5µg/g. Cependant, une hydrolyse préalable est nécessaire : soit une

hydrolyse acide libérant les acides tricarboxyliques qui seront estérifiés par de l'isobutanol, soit une hydrolyse basique qui libérera l'aminopolyol isolé sur XAD-2 puis converti en dérivé triméthylsilyl [24,79].

La chromatographie liquide est la plus employée pour identifier et quantifier la FB1. Une méthode de référence a été établie en accord avec l'IUPAC [79]. La purification s'effectue sur une colonne en phase inverse. L'éluant est principalement le méthanol-phosphate de potassium [24]. Les phases mobiles acétonitrile-phosphate de potassium ou de sodium donnent de moins bons résultats [88]. Comme la FB1 n'absorbe ni dans le visible ni dans l'ultra-violet, une dérivation est nécessaire pour permettre sa détection par fluorimétrie. La réaction de dérivation s'effectue avec le groupe amine primaire. Plusieurs agents ont été utilisés tels que l'anhydride maléique, la fluorescamine, l'o-phthaldialdéhyde, le 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan, le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde et le 9-fluorényl-méthylchloroformate. Bien qu'il soit instable (stabilité d'une semaine), l'o-phthaldialdéhyde est l'agent de dérivation standard. Avec une limite de détection de 5µg/kg (d'après la norme AFNOR), il est plus sensible que l'anhydride maléique avec détection par les détecteurs de dernière génération. L'instabilité du composé FB1-OPA fluorophore serait due à l'absence de groupe hydroxyle en position 1 de la chaîne carbonée, mais la dérivation est reproductible à température ambiante dans un tampon borate (pH=9-10) si le temps entre l'addition de l'OPA et l'injection dans la boucle de l'analyseur est similaire à toutes les manipulations [79].

L'importance de la qualité et de la rapidité des analyses pour la santé humaine a nécessité le développement de nouvelles techniques d'analyses. La méthode de référence reste pour le moment la méthode décrite, mais il existe d'autres méthodes plus rapides ou plus sensibles non encore standardisées ; par exemple, la purification par immunoaffinité est encore récente (1998) [22]. D'autres techniques ont été comparées à l'HPLC : l'analyse par injection de liposomes et immunoaffinité montre une limite de détection plus faible et un temps de préparation inférieur [36] ; une détection par PCR de souches de *Fusarium verticilloides* [63] et une analyse immunoenzymatique pour la détection de fumonisine dans le maïs [62] pourraient automatiser les contrôles de denrées.

## II./ MYCOTOXICOSES ET ACTION CELLULAIRE

Les fumonisines, et plus particulièrement la fumonisine B1, sont responsables de pathologies telles la leucoencéphalomalacie équine (ELEM) ou l'œdème pulmonaire porcine (PPE). Sa responsabilité en matière de cancer chez l'animal est avérée. La FB1 pourrait aussi être corrélée avec la prévalence de cancer de l'œsophage chez l'Homme. Quoi qu'il en soit, les différentes espèces animales réagissent de manières très variables à l'intoxication par la FB1. Nous aborderons les pathologies associées aux espèces très sensibles, puis les modifications pathologiques décrites sur les espèces peu sensibles et enfin nous étudierons l'implication de l'ingestion chronique de FB1 dans les phénomènes de cancérogenèse.

### II.1./ Espèces très sensibles

#### II.1.1./ Equidés

Les équidés représentent une espèce très sensible aux fumonisines dont les affections associées sont, pour la plupart, mortelles [2-24].

##### II.1.1.1./ Leucoencéphalomalacie équine

*Fusarium verticilloides* a été principalement isolé du maïs reconnu responsable d'ELEM (Leucoencéphalomalacie équine) en Afrique du sud dans les années 70. En 1988 c'est plus précisément la fumonisine B1 qui en est reconnue responsable [50].

Il s'agit d'une maladie mortelle faisant suite à l'ingestion de maïs ou de dérivés moisissés, et se traduisant par le ramollissement de la substance blanche de l'encéphale [43]. Des cas ont été observés sur les cinq continents dont une vingtaine en France, dans le Sud-ouest, entre 1994 et 1996 [6].

La maladie a été expérimentalement reproduite, à partir de maïs moisi contenant *Fusarium verticilloides* [10, 47] et plus tard par administration directe de FB1 et FB2 [41, 49]. L'ELEM est reproduite après administration de 20 doses (VO : entre 1 et 4mg/kg PV) de FB1 distribuées pendant 29 jours. Elle apparaît dès les plus

faibles doses mais nécessite une longue phase d'exposition. Par voie intra-veineuse, les quantités et la durée d'administration sont réduites.

Dans les cas observés dans le sud-ouest de la France, des concentrations en FB1 comprises entre 20 et 30 mg/kg d'aliment sont retrouvées dans l'alimentation [6].

Même si elle varie en fonction de l'exposition à la toxine et de l'individu, l'expression de la maladie est essentiellement nerveuse : alternance de phases d'excitation (agressivité, ruades, pousser au mur) et d'abattement (décubitus latéral, coma, bradypnée), puis, pédalage, amaurose et démarche ébrieuse. La mort peut survenir en quelques heures après le début des symptômes [6].

Ces symptômes sont associés à des modifications biochimiques sans altération du bilan hématologique [10]. On note une élévation des marqueurs de cytolyse hépatique et de cholestase ainsi qu'une atteinte du métabolisme des sphingolipides, marqueur précoce de l'intoxication. La protéinorachie est également augmentée (14ng/ml).

A l'autopsie, on note principalement des foyers d'encéphalomalacie dans la substance blanche, un encéphale globalement œdématisé et présentant des zones jaunâtres et fluctuantes, des hémorragies périvasculaires et une démyélinisation diffuse. Le foie ainsi que les voies biliaires sont parfois remaniés [47].

#### II.1.1.2./ Hépatotoxicose

Il s'agit aussi d'une maladie d'évolution fatale, supposée être associée à une consommation de fortes doses de FB1, contrairement à la ELEM qui serait due à des doses plus faibles. La limite entre l'hépatotoxicose et la leucoencéphalomalacie n'est pas nette. En effet, l'hépatotoxicose s'accompagne de lésions du système nerveux et nous venons de voir que la ELEM s'accompagne de modifications hépatiques [47].

La reproduction expérimentale a été possible par administration de 2,5 mg de FB1/kg de poids vif/jour, pendant 7 jours. L'élévation des marqueurs hépatiques est très importante dès le huitième jour. Les symptômes principaux sont l'apathie, l'anorexie, la constipation et l'ictère [49].

A l'autopsie, on constate principalement un ictère généralisé, un foie remanié et un encéphale œdématisé.

Aux vues de ces deux descriptions, le parallèle entre la ELEM et l'hépatotoxicose peut être établi, et conforte l'hypothèse de manifestations cliniques de nature et d'intensité dose-dépendantes et temps d'exposition-dépendantes.

#### II.1.1.3./ Syndrome duodénite/jéjunite proximale

Il s'agit d'un syndrome caractérisé par une dépression, associée à un reflux gastrique parfois hémorragique. A l'autopsie, on note des lésions limitées au duodénum et au jéjunum proximal : des séreuses et des muqueuses rouges, des pétéchies et des ecchymoses.

La maladie ne présente aucun caractère infectieux et les analyses n'ont jamais révélé d'agent pathogène. Cependant, certains auteurs ayant mis en relation une intoxication par FB1 et une entérite hémorragique, Schumacher et ses collaborateurs ont tenté de reproduire la maladie expérimentalement. Les résultats ne permettent pas de conclure à la responsabilité unique de FB1, mais ne permettent pas non plus d'en exclure la participation [70].

#### II.1.2./ Suidés

Le porc est une espèce sensible aux fumonisines. La FB1 est responsable de deux syndromes, l'œdème pulmonaire porcin et une hépatotoxicose.

##### II.1.2.1./ Œdème pulmonaire porcin

Il s'agit d'une maladie connue depuis 1981 (Kriek *et al.*) et reproduite expérimentalement plusieurs fois [42]. La responsabilité du maïs contaminé par *F. verticilloides* puis celle la de FB1 ont été mises en évidence lors de ces expérimentations, la dose responsable de l'œdème pulmonaire est de 175mg/kg d'aliment [19, 68].

Les principaux symptômes sont respiratoires et d'intensité croissante avec l'évolution de la maladie. On observe une tachypnée avec dyspnée et respiration abdominale, une certaine léthargie et des muqueuses cyanosées. Des râles sont parfois audibles et l'issue est fatale quelques jours après le début des symptômes [19].



Chez le porc, les modifications biochimiques sont du même ordre que chez le cheval : les enzymes hépatiques ont une concentration augmentée et le rapport sphinganine/sphingosine est augmenté dans le foie, les reins et les poumons. Cette augmentation est plus précoce dans le sang (5mgFB1/kg d'aliment par voie orale sans que les autres paramètres ne soient altérés) [68]. Le rapport Sa/So semble donc pouvoir être un biomarqueur précoce de l'intoxication des porcs par la FB1.

A l'autopsie, la lésion principale est un œdème interstitiel et interlobulaire accompagné ou non d'hydrothorax. Le foie et les reins peuvent présenter des foyers de nécrose [19].

### II.1.2.2./ Hépatotoxicose

Contrairement au cheval, l'atteinte hépatique est observée lors d'exposition à de faibles doses de FB1 [19].

Les signes cliniques généraux sont de l'apathie, de l'anorexie, une dépression ou perte de poids. Ils peuvent s'accompagner d'ictère.

Les marqueurs biochimiques de lyse hépatique et de cholestase sont augmentés, mais diminuent lors de l'arrêt de l'exposition aux fumonisines [68].

A l'examen nécropsique, après une exposition chronique à 100mg/kg d'aliment pendant 7 jours puis 190mg/kg d'aliment pendant 83 jours, le foie est souvent brun, lisse et présente des nodules ; sa structure interne est également modifiée. Les reins présentent une nécrose tubulaire corticale. On note des troubles de la kératinisation sur le tube digestif (parakératose et hyperkératose de la muqueuse œsophagienne) [14].

Une étude a également montré que, outre les poumons et le foie, la vascularisation cardiaque et pulmonaire est la cible de la FB1. Après six mois d'exposition, on note des modifications de cette vascularisation [13].

## II.2./ Espèces peu sensibles

### II.2.1./ Ruminants

Chez les ruminants, les symptômes d'une intoxication aiguë par la FB1 sont beaucoup plus frustes. On note toutefois, après administration intra-ruminale de

doses comprises entre 11,1 et 45,5mgFB/kg PV pendant 4 jours, des modifications biochimiques des marqueurs hépatiques et rénaux : augmentation des PAL (phosphatases alcalines), ASAT (aspartate amino-transférase), GGT (gamma glutamyl-transférase), LDH (lactate déshydrogénase), TG (triglycérides), cholestérol, urée, créatinine; mais aussi des modifications hématologiques : leucopénie et hyperhémoglobulinémie. Le poids du foie et des reins est également augmenté [25].

### II.2.2./ Volailles

Les effets de 450mg FB1/kg d'aliment sur la croissance sont notables chez le dindon (mais légers chez le canard et le poulet) avec un gain de poids diminué et du rachitisme. Les paramètres biochimiques sont également modifiés pour des doses de 25 à 450mg/kg d'aliment pendant 21jours. Le foie et le pancréas présentent un volume augmenté pour une dose supérieure à 175mg/kg d'aliment [46]. On note une hyperplasie des canaux biliaires, des cellules de Küpfer et une atrophie du cortex thymique pour des doses de 100 et 200mg/kg d'aliment pendant 21jours [94].

Chez le poulet, les modifications notables sont une altération de l'hémostase et des protéines sériques, une diminution de la concentration des lipides hépatiques, mais surtout une augmentation du rapport Sa/So quelle que soit la dose de FB1 administrée (de 10mg/kg d'aliment pendant 6 jours à 300mg/kg d'aliment pendant 8 jours) [28, 35].

L'organe cible de la FB1 chez le canard est le foie, on observe une augmentation de sa taille et une organisation microalvéolaire lors de la phase de gavage. On observe un retard de croissance et une augmentation des enzymes hépatiques, du cholestérol et des protéines sériques. On ne rapporte aucun phénomène d'apoptose [5, 86]. Les modifications hépatiques apparaissent dès une intoxication avec 2mg/kg d'aliment/jour pendant 77 jours [TRAN *et al.* article à paraître en 2005]. Il apparaît que la FB1 aurait un effet plus important lors d'une intoxication de longue durée à une faible dose, que lors d'une exposition courte à une forte dose [87].

Signalons pour finir que des études révèlent l'action tératogène de la FB1 sur les œufs embryonnés. La toxicité est d'autant plus forte que l'inoculation est précoce et que la dose est importante. Les modifications touchent tout d'abord le squelette

(hydrocéphalie, grossissement du bec et allongement du cou) puis tous les organes (foie, reins, cœur, poumons, muscles, intestins, gonades et encéphale) [39]. Toutefois, dans les conditions naturelles, le passage de la FB1 dans les œufs est probablement faible.

### II.2.3./ Primates non humains

Les résultats d'expériences menées sur les primates révèlent des modifications des concentrations de lipides plasmatiques dont l'augmentation serait due à un défaut de clairance hépatique par fibrose. Elles seraient impliquées dans l'apparition d'arrêts cardiaques.

On note également une élévation des paramètres biochimiques témoins d'un dysfonctionnement hépatique (cholestérol, albumine, ASAT, ALAT, LDH, GGT, PAL) et une perturbation de l'hémostase avec augmentation du fibrinogène et du facteur VII de la coagulation [29, 43].

### II.3./ Pouvoir carcinogène

Les propriétés carcinogènes de la FB1 ont été mises en évidence chez le rat mais n'ont pas été démontrées chez d'autres espèces. Casteel *et al.* rapporte l'apparition de nodules d'hyperplasie dans le foie de porc pour des doses de 100mg/kg d'aliment pendant 7 jours puis 190mg/kg pendant 83 jours [14]. Des études épidémiologiques mettent en relation le cancer de l'œsophage chez l'homme avec une alimentation riche en maïs contenant de fortes concentrations en FB1 [59].

#### II.3.1./ Rongeurs

Le rat a permis de mettre en évidence les propriétés cytotoxiques et cancérigènes de la FB1.

Une intoxication de courte durée (4 jours à 4 semaines) entraîne principalement une hépatotoxicité avec cirrhose (hyperplasie hépatocellulaire) et prolifération des canaux biliaires et une néphrotoxicité avec des images d'autophagocytose et de dégénérescence cellulaire dans le cortex dès 15mg/kg d'aliment [68].

Les analyses biochimiques révèlent une augmentation des enzymes hépatiques, du cholestérol et des triglycérides et une élévation du rapport Sa/So dans le foie comme dans le rein lors d'intoxication par des doses de 7,5 à 10mg/kg de poids vif pendant 4 jours par voie intra-péritonéale. On note également une enzymurie importante, une polyurie avec diminution de l'osmolarité urinaire et une diminution du transport d'ions dans les structures corticales sans altérations majeures de l'histologie [85, 9].

Après une exposition de longue durée (50mg/kg d'aliment, 150 jours à 2 ans), diverses équipes ont noté la formation de carcinomes hépatocellulaires, de la cirrhose, de l'adénofibrose, de nodules néoplasiques et de cholangiocarcinome [32, 95, 48]. Après une exposition de 2 ans, des lésions de carcinome stomacal et une hyperplasie des cellules basales de l'œsophage sont rapportées [38]. C'est Gelderblom *et al.* qui établit la responsabilité de la FB1 [30] dans ces phénomènes cancéreux en 1991.

### II.3.2./ Humains

L'importance récemment accordée aux recherches sur la FB1, résulte de la découverte des phénomènes cancéreux décrits plus haut et de l'implication suspectée de cette toxine dans le cancer de l'œsophage et l'athérosclérose [61].

Le taux de cancer de l'œsophage est normalement inférieur à 0.005 pour 100 (5 cas pour 100 000 hommes). En Afrique du sud (Transkei) on rapporte un nombre de cas 10 à 40 fois plus élevé. En Chine, le nombre de cas est multiplié par 2 dans les zones à forte consommation de maïs et la prévalence de l'athérosclérose est aussi plus élevée. Des analyses mycologiques révèlent une contamination du maïs par *Fusarium verticilloides* significativement plus élevée dans ces zones que dans les zones à faible prévalence du cancer de l'œsophage [53], impliquant également une concentration en FB1 significativement plus élevée.

La FB1 est classée dans le groupe 2B (potentiellement cancérigène pour l'Homme) selon la classification de l'Agence internationale de recherche sur le cancer. De nombreuses études sont menées en vue de conclure sur le risque posé par l'ingestion des fumonisines et d'en améliorer leur détection [90].



céramide-synthétase) [93]. L'hypothèse première de l'inhibition était la compétition concentration-dépendante entre la FB1 et la sphinganine du fait de leur correspondance structurale [57].

Une autre étude a démontré que la FB1 était d'abord métabolisée en aminopolyol avant d'inhiber l'enzyme cible [56].

La toxicité de la FB1 pourrait également être due à une altération du métabolisme des acides gras poly-insaturés et des phospholipides. Le stress oxydatif semble également être augmenté lors d'intoxication par la FB1, mettant en jeu l'oxydation lipidique augmentant la concentration en radicaux superoxyde. D'autres actions sont rapportées telles qu'une inhibition des phosphatases, de la GTP-BP (Guanosine tri-phosphate-binding protein), une activation de la PKC (phosphokinase C) et une perturbation des courants calciques [8].

#### II.4.2./ Cytotoxicité et toxicité aiguë

L'altération du métabolisme des sphingolipides entraîne une augmentation de la concentration en sphinganine et une diminution en sphingosine. La sphingosine et les céramides sont des seconds messagers impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires. La sphingosine est principalement connue pour son action inhibitrice de la PKC [34]. Les céramides auraient aussi une action sur la transcription des gènes [16,42].

La cytotoxicité de la FB1 est tout d'abord due à la nécrose induite par le bouleversement cellulaire que crée l'interruption du métabolisme des lipides structuraux et fonctionnels. Elle est également due au phénomène d'apoptose. En effet la FB1 est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G de cellules CV-1 (cellules rénales de singes), la diminution de la concentration en sphingosine entraînant la répression des facteurs de transcription via la PKC [21]. Elle serait également responsable de l'activation des protéines RAS impliquées dans ce phénomène d'apoptose [33].

La FB1 est donc responsable d'altération de la croissance, de différenciation et de mort cellulaire. Elle est à la fois phytotoxique et zootoxique. La cytotoxicité est également différente en fonction du type cellulaire, ce qui expliquerait la diversité des expressions cliniques d'une intoxication.

La toxicité nerveuse, résultant de la lyse de la substance blanche, pourrait être expliquée par la disparition des sphingomyélines des membranes neuronales. On note aussi une atteinte vasculaire due à l'altération de la barrière endothéliale, pouvant également expliquer ces lésions [47, 57].

L'œdème pulmonaire, chez le porc, ne semble pas être dû à une congestion cardiaque, mais plutôt à une modification de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales ou à l'activation du relargage de substances vasoactives des macrophages intravasculaires [19, 94].

#### II.4.3./ Pouvoir mutagène et cancérogène

La fumonisine B1 présente un pouvoir carcinogène chez le rat. Elle semble agir sur les deux phases de la cancérogenèse : l'initiation sans être génotoxique et la promotion [31].

Deux modes d'actions expliquant la carcinogénicité de la FB1 sont proposés. Ils passent par l'altération du métabolisme lipidique. Dans la première hypothèse, la FB1 inhiberait la N-acétyltransférase, dans la seconde, elle perturberait le métabolisme de la  $\delta 6$ -désaturase et de la cyclooxygénase [40].

La conséquence de ces perturbations serait un déséquilibre entre mort et prolifération cellulaire ; déséquilibre contribuant au développement de phénomènes cancéreux. Une inhibition différentielle de la prolifération cellulaire en serait la cause. Les hépatocytes résistants à l'inhibition, auraient une croissance stimulée et développeraient des nodules. Ainsi la FB1 agirait principalement en tant qu'initiateur de la cancérogenèse. Elle augmenterait le risque d'apparition de mutations par augmentation du turn-over cellulaire [40].

### III./ CINÉTIQUE

Les études toxicocinétiques ont principalement été menées chez le rat.

#### III.2.1./ Absorption

Il n'existe aucune donnée disponible sur l'absorption de FB1 par voie pulmonaire ou cutanée. Cependant, puisque la FB1 est présente dans les cellules de *F. verticilloides* (mycélium, spores et conidiophore), il existerait un risque d'absorption par inhalation lors de manipulation de denrées contaminées. Le risque d'une absorption cutanée semble très faible, puisque la FB1 est hydrosoluble et que les composés polaires ne traversent pas la barrière tégumentaire [27].

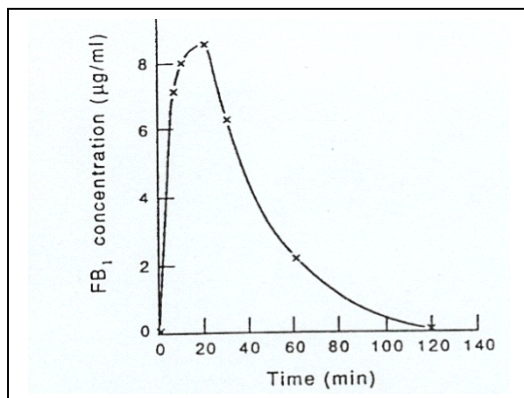


Figure 3 Concentration plasmatique en FB1 en fonction du temps après injection intra-péritonéale [73].

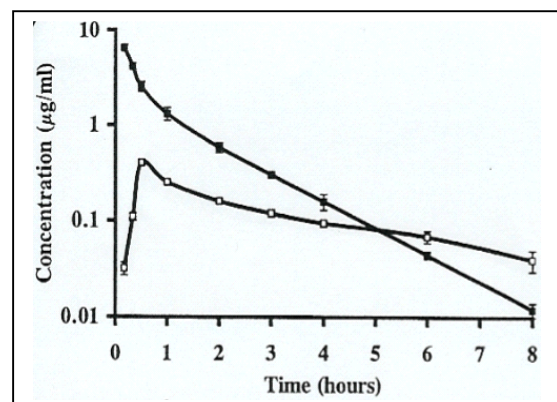


Figure 4 Concentration plasmatique en FB1 en fonction du temps après administration IV (2mg/kg) et VO (10mg/kg) [54].

Lors d'administration par voie orale chez le rat, la fumonisine B1 est très rapidement absorbée avec cependant une absorption plus importante des formes hydrolysées de FB1. L'absorption maximale est atteinte 1,02h après l'administration par voie orale [54] et 20 minutes après l'administration intra-péritonéale [73] (figure 3 et 4).

La quantité de FB1 mesurée dans le plasma après une administration par voie orale chez le porc [65], la poule pondeuse [92], le singe [76], la vache [67] et le rat [75], est très faible (tableau 2).

Chez le rat la biodisponibilité est de 3,5% [54]. De même, le passage dans la circulation générale ne représenterait que 2 à 4% de la dose de <sup>14</sup>C-FB1 administrée



chez le singe [76] et le porc [65]. Chez la poule pondeuse, l'absorption mesurée est inférieure à 1% de la dose totale administrée [92]. Il en serait de même chez la vache laitière [67] (tableau 2).

L'absorption de la FB1 semble souligner une forte différence entre les ruminants et les monogastriques. En effet, deux études menées sur du bétail nourri avec du maïs contaminé ou gavé avec de la fumonisine purifiée montrent que la FB1 est seulement retrouvée à l'état de traces dans le plasma et l'urine [67, 82]. Cette faible biodisponibilité pourrait être due à un métabolisme ruminal puisque 60 à 90% de la FB1 retrouvée dans les fèces est hydrolysée contrairement aux monogastriques chez lesquels la forme majoritaire est la molécule mère [76].

Une étude sur cellules intestinales humaines de lignée Caco-2 montre une faible absorption de FB1 et renforce l'hypothèse d'une plus forte absorption des métabolites hydrolysés [12].

**Tableau 2 Absorption de la FB1 (et FB2 chez le singe).**

Espèce	Voie	Méthode	Tmax	Cmax	Biodisponibilité	Ref
RAT	IP	7,5mgFB1/kg PV	20 min	8,6µg/ml		73
	IP	7,5mgFB2/kg PV	20 min	3,5µg/ml		77
	VO	<sup>14</sup> C-FB1 <sup>14</sup> C-HFB1 <sup>14</sup> C-FB1-fructose 0,47mg/kgPV	Non défini	Non définie	Absorption supérieure des formes hydrolysées	20
	VO	10mgFB1/kg PV	1,02 h	0,18µg/ml	3,5%	54
	VO	7,5mgFB2/kg PV	Non défini	Non détectée	Négligeable 0,2% de la dose retrouvée dans les urines	77
PORC	VO	0,35µCi(0,5mgFB1)/kg	1,10h	33ng/ml	4%	65
POULE	VO	1,28µCi/kg ( <sup>14</sup> C-FB1) (dans 2mgFB1/kg)	1,5-2,5 h	40-145dpm/ml soit 28-103ng/ml	0,71%	92
VACHE	VO	1 et 5 mgFB1/kg PV	Non défini	Non détectée	négligeable	67
SINGE	VO	8,7µCi ( <sup>14</sup> C-FB1) soit 6,42mgFB1/kg PV	1-2 h	210ng/ml	2%	76
	VO	7,5mgFB2/kg PV	3-5 h	25-40ng/ml	< 2%	78

### III.2.2./ Distribution

Lors d'une administration par voie orale chez le rat et le porc, la FB1 radio marquée est retrouvée dans la plupart des tissus notamment le foie et les reins [61]. En règle générale, le foie contient plus de FB1 que les reins, cependant une étude de Norred (1993) montre le contraire.

Chez la rate gestante [91], 1heure après l'administration d'une dose de <sup>14</sup>C-FB1 par voie IV, 14,5% et 4% de la dose administrée sont retrouvés respectivement dans le foie et les reins. On en retrouve cependant seulement de 0,24% à 0,44% dans l'utérus, de 0 à 0,04% dans le placenta et moins de 0,015% dans le fœtus lui-même. D'autres études ont corroboré l'idée qu'il n'existe qu'un faible transfert de la FB1 par la barrière placentaire chez le rat [17,18] et le lapin [44].

Chez le porc (tableau 3), on retrouve aussi de faibles concentrations dans les poumons, la rate et les muscles squelettiques. L'accumulation tissulaire de la FB1 est notée tant qu'elle n'est pas retirée du régime alimentaire de l'animal et on estime à 2 semaines le temps nécessaire à la disparition de la FB1 du foie et des reins [58, 66].

Ce schéma de distribution est aussi applicable à la poule pondeuse [92] aux primates [76] et aux vaches [67]. Cependant la faible biodisponibilité chez ces dernières implique une très faible distribution tissulaire. Elle se limite à quelques traces détectées dans les tissus précités. Aucun résidu n'est retrouvé dans les œufs et de faibles traces sont détectées dans le lait de vaches [83].

**Tableau 3 Distribution et excrétion de la FB1.**

Espèce	Voie	Méthode	Distribution		Ref.
RAT	IV	2mg/kg PV	Foie : 0,22µg/ml Rein : 2,35µg/ml	foie/serum: 2 rein/serum: 30	54
	IP	0,29µCi (7,5mg)/kg PV 106 000 dpm/rat	Après 24h : Fécès : 66% Urines : 32%	Foie : 1% Rein : <1%	75
	VO	0,29µCi (7,5mg)/kg PV 93 000 dpm/rat	101% de la dose retrouvée dans les fécès après 24h		
PORC	IV	0,25µCi (0,4mg)/kg PV	Foie 1076 ng/g Rein : 486 ng/g		65
	VO	0,35µCi (0,5mg)/kg PV	10 à 2 fois moins que lors de l'IV		

PORC (suite)	VO	3mg <sup>14</sup> C-FB1/kg d'aliment 12j (soit 3μCi) puis 2mg <sup>14</sup> C-FB1/kg d'aliment 12j (soit 2μCi)	Foie : 347 dpm/g 160 ng/g rein : 146 dpm/g 65ng/g	66
	VO	100mgFB1/Animal/j 5-11j	Résultats difficilement interprétables : SD>MOY des valeurs détectées	58
POULE	IV	0,64μCi/kg dans 2mg/kg PV	Traces après 24 h dans foie, reins et caecum	92
	VO	1,28μCi/kg dans 2mgFB1/kg PV	Traces 24 h après gavage dans jabot, foie, reins, intestin grêle et caecum. nulles dans œufs	
VACHE	VO	1 et 5 mgFB1/kg PV	Non déterminable, pas d'absorption	67
SINGE	IV	2,33μCi ( <sup>14</sup> C-FB1)/kg PV soit 1,72mgFB1/kg PV	Foie : 1,92% de la dose initiale Muscle : 0,62% Rein : 0,37%	76
	VO	8,7μCi ( <sup>14</sup> C-FB1)/kg PV soit 6,42mgFB1/kg PV	Foie : 0,64% de la dose initiale Muscle : 0,14% Rein : 0,03%	
	VO	3 000 000dpm 8mgFB1/kg PV	Muscle : 1% de la dose initiale Foie : 0,4% Cerveau : 0,2%	80

### III.2.3./ Métabolisme

Peu de données sont disponibles sur le métabolisme de la FB1. Cependant la principale forme d'excrétion biliaire et urinaire est la molécule mère. Chez le singe, la fraction de FB1 retrouvée dans les fèces est sous une forme partiellement hydrolysée (mono-esters par perte d'un acide propan-tricarboxylique), alors que la fraction retrouvée dans l'urine est composée de 96% de FB1 non hydrolysée. Il apparaît donc clairement que le métabolisme de la FB1 se déroule dans le tube digestif sous l'action d'enzymes ou de micro-organismes et non dans le foie puisque aucun métabolite n'est retrouvé dans les voies biliaires [76].

De plus, une étude menée sur des hépatocytes de rats et une après incubation directe de FB1 en présence d'enzymes de biotransformation (sous forme de microsomes) ne révèlent aucune production de métabolite de la fumonisine. Ceci confirme qu'il n'existe pas ou peu de métabolisme hépatique de la FB1 [15]. On note

cependant une induction de l'activité des cytochromes P4501A1 et P4504A1 lors d'injections répétées de FB1 par voie intra-péritonéale, sans qu'elle permette de conclure à une métabolisation de la FB1 par ces enzymes [57].

Lors d'expérimentation sur la vache laitière nous avons vu que la FB1 n'était pas ou peu retrouvée dans le lait. Aucun de ses métabolites ou conjugués ne l'est non plus [72].

### III.2.4./ Elimination

Chez le rat, après une administration IV, la FB1 est rapidement éliminée du compartiment central, il ne reste que 20ng/ml de plasma 8heures après l'administration de 2mg/kg PV [3].

On note une première phase d'élimination rapide et simultanée à la phase de distribution, son temps de demi-vie est court : de l'ordre de 10-20min [73]. Le temps de demi-vie d'élimination est de l'ordre de 1 heure [3] (tableau 4).

Différentes voies d'élimination de la FB1 ont été mises en évidence. La FB1 est majoritairement éliminée par voie biliaire : 67% de la dose administrée par voie IV est retrouvée dans la bile dans les 24 heures [81]. Elle est également éliminée par les voies urinaire et fécale [73,60].

Par voie orale, la majorité de la FB1 administrée est éliminée dans les fécès. Le temps de demi-vie plasmatique est de 3,15 heures, de 4heures dans le foie et 7 heures dans les reins [54].

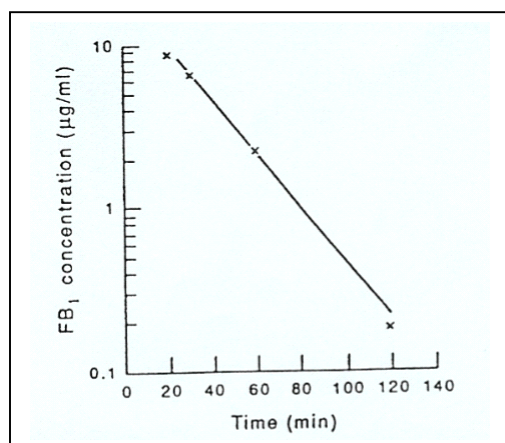
Chez le singe, la poule pondeuse et la vache laitière l'élimination plasmatique de la FB1 est rapide, les temps de demi-vie d'élimination sont respectivement de l'ordre de 40 min [80], 49min [92] et 17min [67]. La clairance plasmatique est de 9 ml/min/kg chez le porc et de 1,18ml/min/kg chez la poule [65, 92].

Chez le porc, la cinétique est toujours rapide mais pas autant que chez les espèces précitées. Le temps de demi-vie d'élimination est de l'ordre de 3 heures. Cependant, lors d'une cathétérisation des canaux biliaires, le temps de demi-vie est diminué à 96 minutes [65].

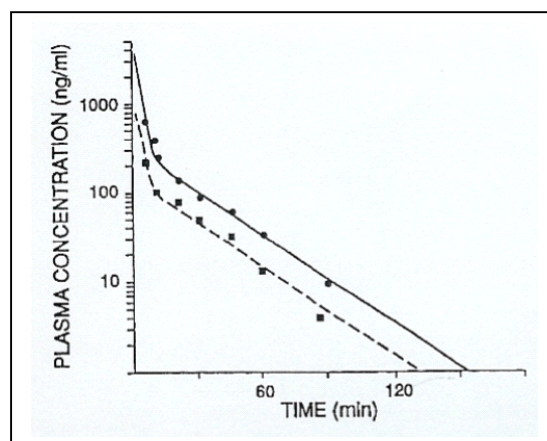
La FB1 est retrouvée dans le lait (à de très faibles doses) après une administration directe dans la vascularisation mammaire [83]. Aucune trace de FB1 n'est détectée dans les œufs de poules intoxiquées [92].

### III.2.5./ Modélisation

La modélisation du devenir de la FB1 (comme celle de la FB2), après une administration par voie intra-péritonéale chez le rat, aboutit à un modèle à un compartiment [73,77] (figure 5). En effet, la visualisation des concentrations plasmatiques suit une courbe mono-exponentielle. La modélisation du devenir de la FB1 après une voie orale pose problème puisque la biodisponibilité est très faible et que la faible dose absorbée est distribuée vers un large éventail de tissus [76]. Le devenir de la FB1 semblerait toutefois suivre une courbe bi-exponentielle représentant un modèle à deux compartiments [54,3] (tableau 4).



**Figure 5 Représentation semi-logarithmique de la phase d'élimination de la FB1 après administration intra-péritonéale [73].**



**Figure 6 Représentation semi-logarithmique des concentrations plasmatiques en FB1 de deux animaux après administration IV [67].**

De même, la modélisation du devenir de la FB1 chez le singe, la poule pondeuse et la vache laitière aboutit à un modèle à deux compartiments, les cinétiques suivent des courbes bi exponentielles (figure 6).

Chez le porc, la modélisation correspondrait plutôt à un modèle à trois compartiments avec une cinétique suivant une courbe tri-exponentielle. Après cathétérisation des voies biliaires on obtiendrait un modèle à deux compartiments. Cette différence s'expliquerait par l'importance d'un cycle entérohépatique absent des cinétiques précédentes [65].

**Tableau 4 Modélisation de la toxicocinétique de la FB1 (et FB2).**

Espèce	Voie	Dose administrée	T1/2 vie (min)	Modèle	Ref.
RAT	IV	2mgFB1/kg PV	15 min 61min	Courbe bi-exponentielle Modèle à deux compartiments	3
	IV	2mgFB1/kg PV	14 min 63 min	Courbe bi-exponentielle Modèle à deux compartiments	54
	IP	7,5mgFB1/kg PV	18 min	Courbe mono-exponentielle avec fusion de la phase d'absorption et de distribution Modèle à un compartiment	73
PORC	IV	0,25 $\mu$ Ci/kg PV (0,4mgFB1/kg PV)	2 min 10,5min 182min	Courbe tri-exponentielle Modèle à trois compartiments avec importance d'un cycle entérohépatique.	65
POULE	IV	0,64 $\mu$ Ci/kg dans 2mg/kg PV	2,5 49 min	Courbe bi-exponentielle Modèle à deux compartiments	92
VACHE	IV	1 et 5 mgFB1/kg PV	2min 16,5 min	Courbe bi-exponentielle Modèle à deux compartiments Elimination rapide	67
SINGE	IV	2mgFB1/kg PV	30 min 40 min	Courbe bi-exponentielle Modèle à deux compartiments	80
	IV	2mgFB2/kg PV	18 min	Courbe bi-exponentielle Modèle à deux compartiments Elimination plus rapide de la FB2	78

Les divers travaux déjà menés sur la toxicité de la FB1 ont permis de déterminer sa toxicocinétique. Ils nous ont permis de mettre en place des protocoles expérimentaux en vue de réaliser des expérimentations sur la toxicocinétique de la FB1 chez le canard.

## DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE EXPERIMENTALE

Nous venons d'aborder les généralités concernant la fumonisine B1. Dans cette seconde partie, nous allons exposer nos travaux sur la cinétique de la FB1 chez le canard. Le but de ces expérimentations est de définir le type de cinétique après administration d'une dose unique de FB1 et de la comparer aux résultats publiés pour les autres espèces.

### I./ MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### I.1./ Matériel

Le standard de fumonisine B1 (CAS N° 116355-83-0) ayant servi à la partie analytique a été fourni par Sigma. Une solution stock à 25 µg/ml (35 µM) est préparée dans un mélange acétonitrile/eau (1/1), puis diluée dans le même solvant pour obtenir des solutions allant de 0.001 à 2,5 µg/ml. *PM 721,8 g/mol.*

La fumonisine B1 utilisée pour l'expérimentation animale, a été produite et purifiée par l'équipe de Mycologie de l'ENVT. Le contrôle analytique des solutions injectées a été réalisé par deux techniques différentes (CCM et HPLC).

Les solvants : l'acétonitrile et le méthanol nous ont été fournis par Scharlau (Barcelone, Espagne). Les produits chimiques : l'acide borique, le borate de sodium, le 2-mercaptoéthanol et l'orthophthaldialdéhyde nous ont été fournis par Sigma (St Louis, MO, USA).

L'agitation est réalisée sur une table d'agitation IKA Labortechnik et la centrifugation est permise par une centrifugeuse GR 200 SX JOUAN . L'évaporation est réalisée sous hotte et courant d'azote.

Les filtres utilisés sont des membranes filtrantes nylons d'une porosité de 45 µm (ICS, Toulouse, France).

Le système chromatographique est constitué d'une pompe M 2200 (Bischoff, Leonberg, Allemagne) reliée une colonne prontosil C-18, de 5µm de porosité, et de taille 250 x 4,6 mm (Bischoff chromatography, Allemagne), celle-ci est protégée par

une pré-colonne du même fournisseur et de même nature que la colonne. La mesure de fluorescence est assurée par un détecteur RF 10A XL (Shimadzu, Japon) et les chromatogrammes obtenus, sont retraités par le logiciel pic3 (ICS, France).

## I.2./ Animaux

Les canards nécessaires aux trois expérimentations sont de type Mulard. Ils sont issus du croisement entre un mâle de barbarie (*Cairina moschata*) et une cane dite « commune » (*Anas platyrhynchos*) généralement de type Pékin. Ils ont été fournis par la société Pyrénées Gascogne Aviculture (l'Isle Jourdain, France)

Trois protocoles sont utilisés ici en vue d'analyser le profil plasmatique de FB1 et d'évaluer sa teneur dans les organes de canards.

Le protocole A9 permet de recueillir des échantillons de sérum de deux canards Mulards de 2.5kg environ ayant reçu une dose de FB1 de 10mg/kg par voie intra-péritonéale (volume d'injection = 1ml/kg). Le sang est prélevé sur tubes EDTA à intervalle de temps définis (0 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ; 120 ; 240 min) puis est centrifugé à 2000g pendant 15 min. Le sérum déposé au congélateur à la température de -80°C. Le dosage est effectué par HPLC-fluorescente après extraction en phase liquide.

Le protocole B9 permet de recueillir des échantillons de sérum de trois canards Mulards de 2.5kg environ ayant reçu une dose de FB1 de 160mg/kg par voie orale (volume d'injection = 10ml/kg). Les intervalles de temps sont allongés par rapport au protocole A9 (0 ; 30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 150 ; 180 ; 210 ; 240 ; 360 ; 480 min). Puis les échantillons sont traités de la même façon.

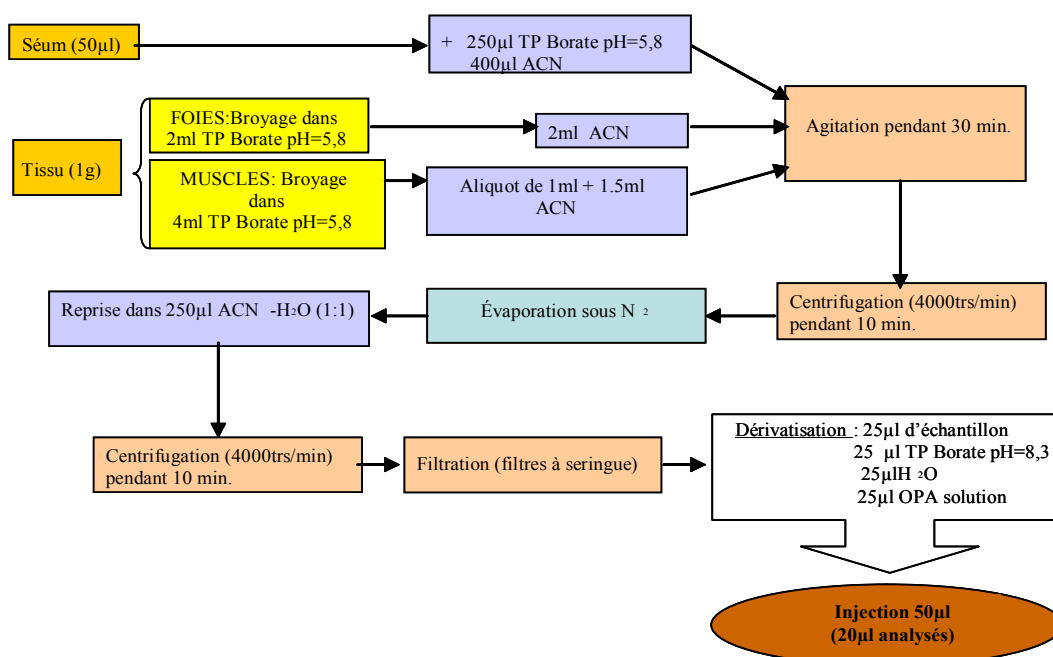
Le protocole C9 permet de recueillir le sérum et les organes de 10 canetons Mulards d'environ 300g ayant reçu une dose de FB1 de 10mg/kg par voie intra-péritonéale (volume d'injection = 1ml/kg). Les animaux sont sacrifiés à des intervalles de temps prédéfinis (0 ; 30 ; 60 ; 120 ; 240) leur sang et leurs organes sont récupérés (foies, muscles et reins). Les échantillons de sang sont traités de la même façon que précédemment. Les organes sont également conservés au congélateur à la température de -80°C.



### I.3./ Dosage de la FB1

#### I.3.1./ Méthode d'extraction

L'extraction ne se déroule pas sur colonne échangeuse d'anion mais en milieu liquide. Le principe est similaire au sérum et aux tissus. Cependant quelques variations sont notables (figure 7).



Notes: \*TP Borate: **A** Acide Borique 100mM (618mg A.Borique/100ml H<sub>2</sub>O)  
**B** Tétraborate de Sodium 100mM (3,8g/100ml H<sub>2</sub>O)  
pH=8,5: 45ml **A** + 5ml **B**  
pH=5,8: 100ml **A** + goutte à goutte **B**  
\*OPA solution: 10ml ACN + 20mg OPA  
20µl 2-mercaptoethanol

Figure 7 Méthode d'extraction de la FB1 dans le sérum et les tissus

##### I.3.1.1./ Sérums

A 50 µl de sérum sont ajoutés 250 µl de tampon borate (pH=5.8) et 400 µl d'acétonitrile. Après 30 minutes d'agitation à raison de 300 agitations par minute, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 2500g. Le surnageant est récupéré puis évaporé à l'abri de la lumière sous un courant d'azote. Le résidu sec est enfin repris

dans 250 µl de mélange acétonitrile/eau (V/V). Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 2500g puis filtrés sur membrane filtrante nylon d'une porosité de 45 µm.

#### I.3.1.2./ Tissus

Les échantillons de foie, sont broyés au Potter téflon à 500 tours par minute dans du tampon borate (pH=5.8). Les échantillons de muscle sont eux broyés au Turrax à 3000 tours par minute. Le volume du tampon doit ici être adapté à la nature et à la quantité de tissu prélevé. Nous avons utilisé 2 ml de tampon borate pour un gramme de foie et 4 ml pour un gramme de muscle. L'extraction par l'acétonitrile est la même que pour les sérums. Il est cependant nécessaire de respecter les proportions entre le tampon et l'acétonitrile afin de bien précipiter les protéines. Une deuxième précipitation par 2ml d'acétonitrile à été testée et n'apporte rien de plus (données non présentées). Les échantillons sont ensuite centrifugés et filtrés comme pour les sérums.

#### I.3.2./ Dosage

Tous les échantillons ainsi obtenus et les standards de solutions de fumonisine B1 sont dérivatisés par de l'OPA (10ml d'acétonitrile+20mg d'OPA+20µl de 2-mercaptoéthanol). 25 µl d'OPA, 25 µl de tampon borate 0.1M pH 8.3 et 25 µl H<sub>2</sub>O sont ajoutés à 25 µl d' ACN-eau (1 :1), de standard ou d'échantillon. Après 10 minutes à température ambiante, le mélange est vortexé et un volume de 50 µl est injecté dans le système chromatographique (20µl analysés. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

Solvant d'élution : Methanol / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M, pH=3.35, (75/25, v/v)

Débit : 1,00 ml/min

λEx 335 nm ; λEm 440 nm

Volume injecté : 20 µl

Colonne : prontosil C18 (250\*4.6mm)

## II./ RÉSULTATS

Nous présenterons tout d'abord les critères de performances et les données de validation de la méthode analytique, puis les résultats des études de toxicocinétique.

### II.1./ Validation

Les solutions diluées de standards de FB1 sont utilisées pour réaliser une étude de régression. Pour cela, les injections sont réalisées en triplicate pour chaque concentration. Par la suite on vérifiera que la relation entre quantité injectée et réponse observée (ici l'aire) peut être considérée comme une droite. Dans notre cas, onze points de gamme ont été testés entre 0.001 et 2.5 µg/ml (Annexe1). Le facteur de réponse a également été calculé (tableau 5).

La répétabilité a été évaluée grâce à un même standard de concentration 0.25µg/ml injecté 5 fois successivement (tableau 6).

Ensuite un standard à 0.1 µg/ml est testé sur une longue période de temps afin d'accéder à la précision entre analyses (« between run precision ») (tableau 7).

Quelques uns de ces standards servent également à compléter des échantillons pour avoir accès au pourcentage d'extraction.

#### II.1.1./ Linéarité

La réponse (aire en  $\mu v \cdot s$ ) du détecteur en fonction de la concentration (en µg/ml) semble linéaire sur une gamme de concentration comprise entre 0 et 2.5 µg/ml (figure 8). Le coefficient de corrélation obtenu est de 0.999, mais il ne permet à lui seul de certifier la linéarité. Nous avons donc également réalisé une approche complémentaire de vérification de la linéarité en estimant le coefficient de variation du facteur de réponse de la droite de régression (tableau 5). Pour les deux premiers points de gamme le facteur de réponse n'est pas constant. Ces résultats permettent d'estimer la limite de détection à 0.0025µg/ml et la limite de quantification à 0.005µ/ml

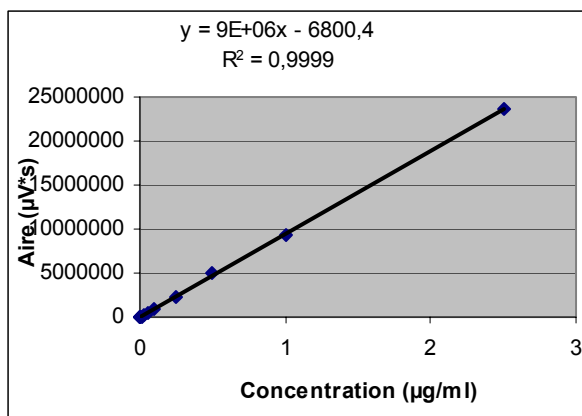


Figure 8 Réponse du détecteur en fonction de la concentration en FB1- droite de regression et coefficient de corrélation.

Tableau 5 Etude du facteur de réponse sur la gamme de standards utilisée.

Concentration (µg/ml)	Aire moyenne	Facteur de réponse	
0	14103		
0,001	21553	21552500	
0,0025	31068	12427200	
0,005	49234	9846700	
0,01	89886	8988550	
0,025	247259	9890340	
0,05	492150	9843000	
0,1	870581	8705805	
0,25	2266289	9065156	
0,5	4906620	9813240	
1	9292997	9292997	
2,5	23702423	9480969	
		<b>Moy.</b>	9436306
		<b>E. type</b>	418523
		<b>CV%</b>	<b>4,44</b>

### II.1.2./ Fidélité : Répétabilité (r) et Reproductibilité (R)

Un même échantillon de concentration 0.25 µg/ml est injecté cinq fois successivement dans le système chromatographique. Le pourcentage de variation obtenu sur l'aire enregistrée par le logiciel d'intégration est de 2,97 % (tableau 6).

Tableau 6 Répétabilité d'un même échantillon à 0,25µg/ml de FB1.

STANDARDS 0,25µg /ml	AIRE
15/01/04	3324318
15/01/04	3431101
15/01/04	3266436
15/01/04	334600
15/01/04	3520247
<b>Moyenne</b>	<b>3375340</b>
<b>Ecart type</b>	<b>100288</b>
<b>CV%</b>	<b>2,97</b>

Tableau 7 Reproductibilité d'un échantillon à 0,1µg/ml de FB1.

STANDARDS 0,1µg/ml	AIRE
03/12/04	1283352
01/12/03	1438116
27/11/03	1370444
26/11/03	1462433
25/11/03	1400631
21/11/03	1338631
<b>Moyenne</b>	<b>1382268</b>
<b>Ecart type</b>	<b>65895</b>
<b>CV%</b>	<b>4,77</b>

Un même échantillon de concentration 0.1 µg/ml est injecté chaque jour durant une semaine (n= 6). Le pourcentage de variation obtenu sur l'aire enregistrée par le logiciel d'intégration est de 4.77 % (tableau 7).

### II.1.3./ Pourcentages d'extraction

Les pourcentages d'extraction ont été obtenus par analyse d'échantillons supplémentés. Elles ont été réalisées en triplicate sur des sérums ou des homogénats tissulaires exempts de FB1.

Les sérums ont été supplémentés à 0.1 et 0.5 µg/ml (concentrations moyenne dans notre gamme). Les résultats donnent un pourcentage d'extraction plasmatique de 45%

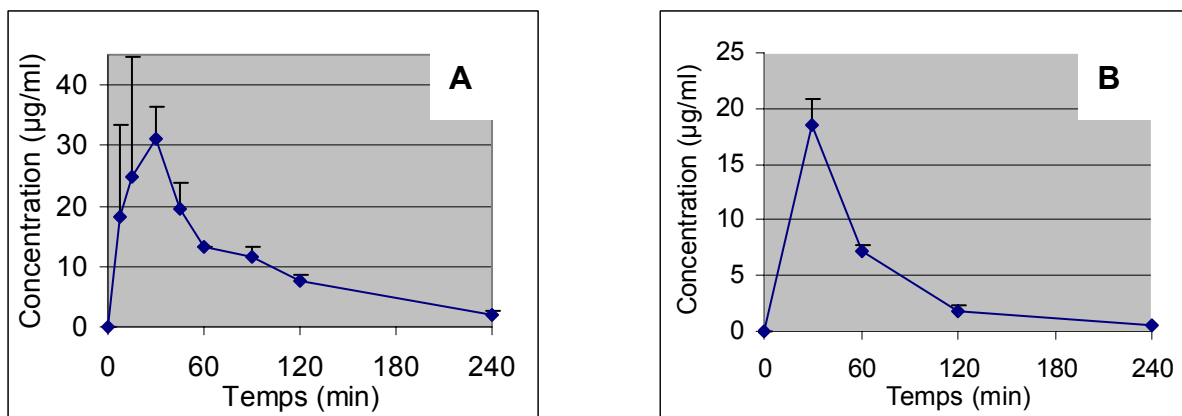
Les foies ont été supplémentés à 0.05, 0.1, 0.25 et 1 µg/ml et pour les échantillons de muscle, seule la concentration de 0.8 µg/ml a été testée. Le pourcentage d'extraction hépatique est de 56% et le musculaire est de 93%.

## II.2./ Cinétiques

### II.2.1./ Administration intra-péritonéale (IP)

Après administration intra-péritonéale (10mg/kg) sur des canards adultes, on note une absorption rapide de la FB1 (figure 9 A). L'annexe 2 montre un chromatogramme type détecté après analyse d'un échantillon de sérum. Le Tmax est obtenu à 30 min, la concentration maximale détectée est en moyenne de 31,2µg/ml de sérum. Survient alors une phase de décroissance rapide pendant 30 min à 1 heure puis une deuxième phase plus lente. 4 heures après l'injection, les concentrations plasmatiques sont voisines de 2µg/ml.

Chez les canetons de 300g ayant reçu une injection de solution de FB1 par voie intra-péritonéale (volume d'injection=1ml/kg), le profil plasmatique de la FB1 est similaire à celui des canards adultes (figure 9 B): Cmax apparaît à 30min et la décroissance est rapide (0.5µg/ml à T=4heures). Le pic plasmatique de FB1 est de 18,6µg/ml. Les chromatogrammes types sont présentés en annexe 3 et 4.

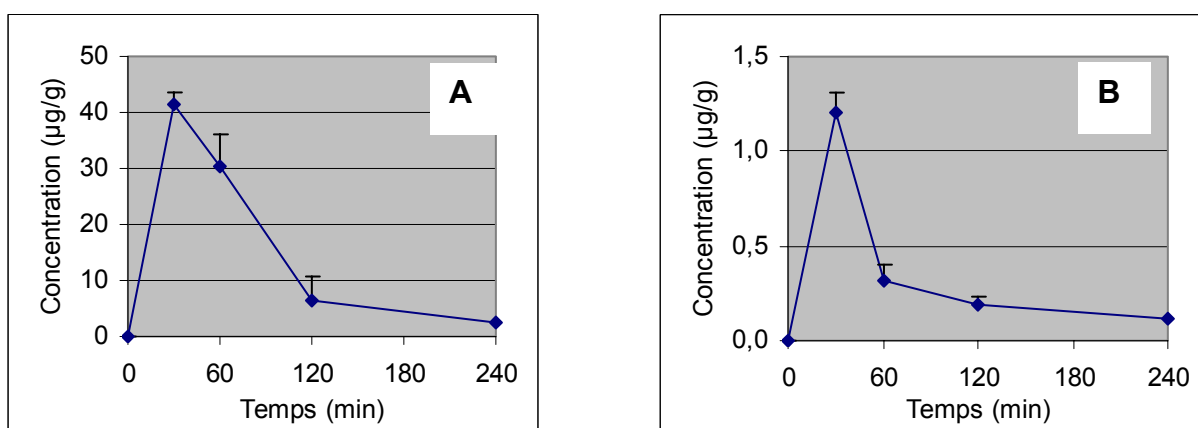


**Figure 9 Cinétique sérique moyenne de la FB1 après administration de 10mg/kg par voie intra-péritonéale. A : Canards adultes (2kg PV) ; B : Canetons (0,25kg PV)**

La cinétique établie chez les canetons est similaire à celle adultes. Ce résultat suggère que les données tissulaires obtenues chez les canetons ne devraient pas être différentes de celles qui pourraient être obtenues chez l'adulte.

Dans les foies (figure 10 A), la concentration maximale en FB1 apparaît à 30min et s'élève en moyenne à 41,4µg/g de tissu. 240 min après injection, on retrouve encore 2,5µg/g de FB1.

Dans les muscles (figure 10 B), la concentration maximale n'atteint que 1.2µg/g à 30 min. En fin d'expérimentation à 240 min, elle est de 0.1µg/g.

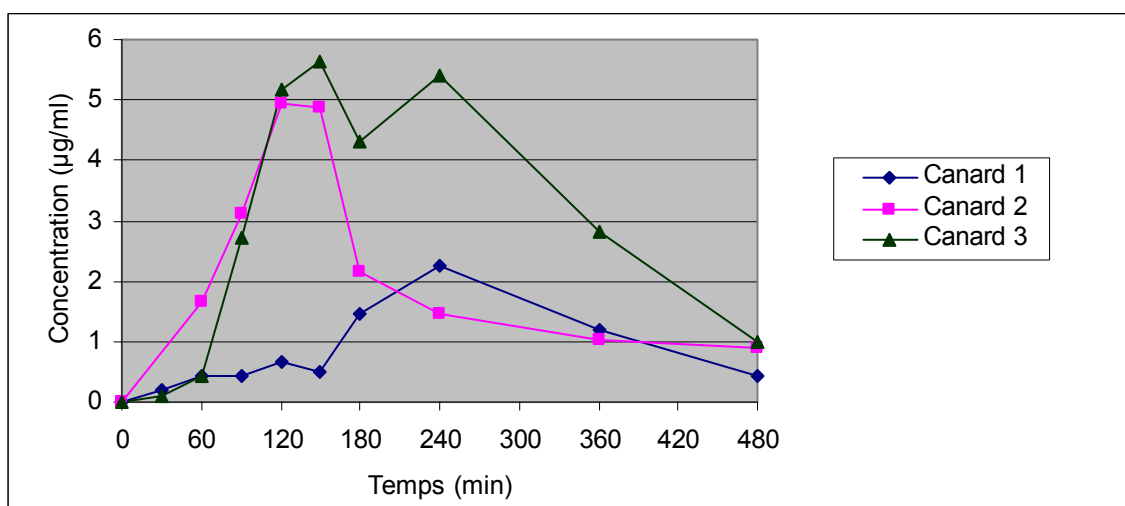


**Figure 10 Cinétique tissulaire moyenne de la FB1 après administration de 10 mg/kg par voie intra-péritonéale à des canetons (0,25kg). A : Foies ; B : Muscles.**

## II.2.2./ Administration par voie orale (VO)

Trois canards de 2.5kg ont reçu une dose de FB1 de 160mg/kg par voie orale (volume injecté=10ml/kg). Le tracé chromatographique de la FB1 est du même type que lors d'injection intra-péritonéale (Annexe 5). Le pic plasmatique apparaît entre 2 et 4 heures après administration (figure 11). La concentration plasmatique maximale moyenne est de 5,3 µg/ml. 8 heures après l'administration, on note une concentration plasmatique de l'ordre de 1µg/ml. Il faut cependant noter une forte variation individuelle pouvant être expliquée par les variabilités de temps de vidange du jabot. En effet, le canard 2 présenterait une courbe théorique avec vidange rapide et totale du jabot, sous l'effet du stress le canard 1 a pu n'effectuer qu'une vidange retardée et partielle. Pour le canard 3, l'hypothèse serait une vidange en deux temps ou un mélange des deux phénomènes précédents.

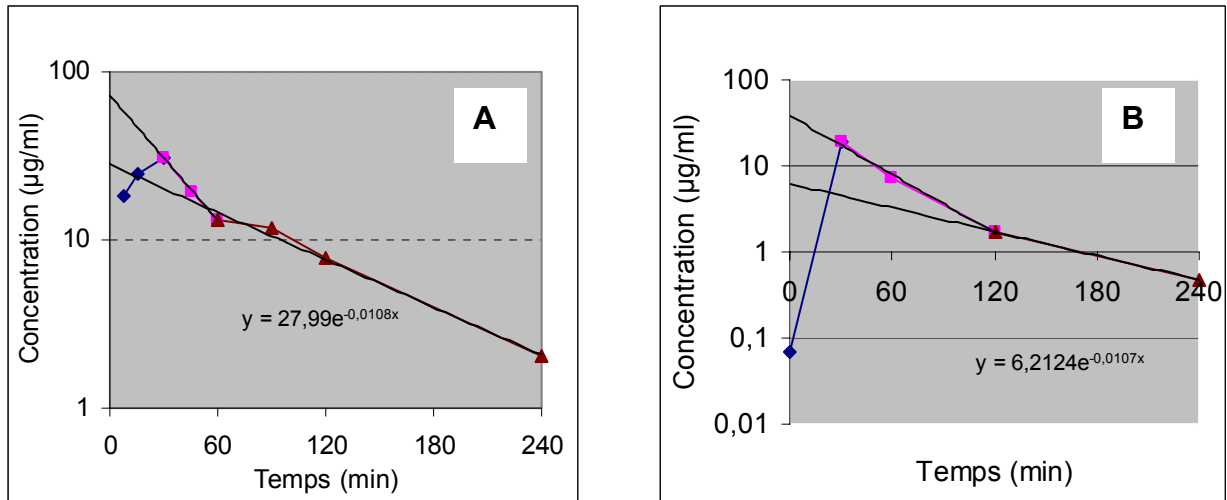
Une telle variabilité ne permet pas d'établir une cinétique moyenne. Il apparaît toutefois que les concentrations sériques maximales sont du même ordre de grandeur et que le Tmax théorique serait plutôt aux environs de 2 heures après administration, lors de vidange rapide du jabot.



**Figure 11** Cinétique de la FB1 dans le sérum des canards maigres adultes après administration d'une dose de FB1 de 160mg/kg par voie orale.

### II.2.3./ Modélisation

Le devenir de la fumonisine après une administration intra-péritonéale suit une courbe bi-exponentielle dans nos deux expériences. Les temps de demi-élimination sont de 64,18 min pour l'expérimentation sur adultes (figure 12 A) et de 64,79 min pour celle sur canetons (figure 12 B).



**Figure 12 Représentation, en échelle semi-logarithmique, de la cinétique plasmatique de FB1 après administration intra-péritonéale de FB1 (10mg/kg). A : Canards adultes (2kg) ; B : Canetons (0,25kg).**



### III./ DISCUSSION

#### III.1./ Protocoles

Dans notre étude les doses d'exposition sont très élevées 10mg/kg PV par voie IP et 160mg/kg PV par voie orale, par rapport à une intoxication de terrain, mais sont semblables aux concentrations utilisées dans les études de cinétique précédemment menées [54, 75, 73, 65, 66, 67, 92, 76, 80].

On peut supposer que cela ne pose pas de problème de validation puisque aucun phénomène actif d'absorption de la fumonisine n'est décrit, et qu'il n'existe pas de métabolisme connu de cette toxine. Aucun phénomène saturable n'est donc supposé. Les connaissances actuelles suggèrent donc que la toxicocinétique de la FB1 est linéaire en fonction de la dose.

#### III.2./ Validation de la méthode

Notre méthode de dosage est linéaire dans un intervalle de mesures compris entre 0,0025µg/ml et 2.5µg/ml. La limite de détection est de 0,0025µg/ml et la limite de quantification de 0,005µg/ml. Ces résultats sont similaires à la norme AFNOR.

Notons que certaines valeurs correspondant au Tmax sont nettement supérieures à 2.5µg/ml. Les échantillons correspondants ont nécessité des dilutions pour permettre un dosage précis.

Les résultats obtenus sont exprimés en prenant en compte les pourcentages d'extraction de 45% dans le sérum, de 56% dans le foie et de 93% dans le muscle.

#### III.3./ Absorption de la FB1

Dans notre étude les Tmax sont obtenus 30 min après une administration IP et 2,5 h après une administration orale. Ces résultats sont en accord avec les résultats décrit chez le rat [73, 54], le porc [65], la poule [92] et le singe [76]. En effet, l'ordre de grandeur du temps pour atteindre une concentration maximale en FB1 est de 20 minutes après un administration par voie intra péritonéale et de 1 à 2 heures

après une administration par voie orale dans toutes les espèces déjà testées (tableau 8).

Dans notre étude, la biodisponibilité calculée est comprise entre 2,27% et 3,75% chez le canard adulte après administration d'une dose de 160mg/kg de FB1 par voie orale. Ce résultat est très proche de ce qui avait déjà été rapporté chez les monogastriques [54, 65, 76] mais s'éloigne des résultats décrits chez la poule pondeuse et chez les ruminants [92, 67]. La faible biodisponibilité observée chez les ruminants, peut être liée à la dégradation de la toxine par les bactéries du rumen. Rien ne permet d'expliquer la faible biodisponibilité rapportée chez la poule pondeuse. Quoiqu'il en soit ces valeurs sont faibles, et témoignent de la faible absorption de la FB1.

**Tableau 8 Absorption de la FB1.**

Espèce	Technique	Caractéristiques	Biodisponibilité	Réf
Rat	10mgFB1/kg PV VO	Tmax=1 h Cmax=0,18µg/ml	<b>3,5%</b>	54
	7,5mgFB1/kg PV IP	IP : Tmax= <b>20min</b> Cmax=8,6µg/ml		73
Porcs	0,35µCi(0,5mgFB1)/kg PV VO	Tmax= <b>1,10h</b> Cmax=33ng/ml	<b>3-6%</b>	65
Poules	1,28µCi/kg ( <sup>14</sup> C-FB1) (dans 2mgFB1/kg) VO	Tmax= <b>1,5-2,5 h</b> Cmax= 28-103µg/ml	<b>0,71%</b>	92
Singes	8,7µCi ( <sup>14</sup> C-FB1) soit 6,42mgFB1/kg PV VO	Tmax= <b>1-2h</b> Cmax <210ng/ml	<b>2%</b>	76
Canard	160mg/kg PV VO	Cmax : 5,0µg/ml Tmax : 2 h	<b>2,7-3,5%</b>	Résultats présentés
	10mg/kg PV IP	Cmax : 31,2µg/ml Tmax : 30 min		

### III.4./ Distribution de la FB1

Dans notre étude on trouve un rapport Foie/Sérum du même ordre que chez le rat : 3,13 [54]. Le rapport Foie/Muscle de l'ordre de 44. Il diffère de celui obtenu chez le singe qui est de 4 [76]. La FB1 est présente dans les muscles mais en plus faible quantité, le rapport Muscle/Sérum est de 0,07 (tableau 9).

Les organes dans lesquels on retrouve le plus de fumonisine sont les reins et le foie. La détermination de la FB1 dans les reins n'a pas été possible dans notre étude à cause d'interférences avec la méthode d'analyse. On ne retrouve que des traces de la radioactivité chez la poule pondeuse [92].

**Tableau 9 Distribution tissulaire de FB1.**

Espèce	Technique		Répartition	Réf
Rats	VO : 10mgFB1/kg PV		<b>Rein/Plasma=29,89</b> <b>Foie/plasma=2,03</b>	54
	IP : 0,29 $\mu$ Ci (7,5mg)/kg PV 106 000 dpm/rat		<b>Foie : 1%</b> <b>Reins : &lt;1%</b>	75
Porcs	VO : 3mg <sup>14</sup> C-FB1/kg d'aliment (soit 3 $\mu$ Ci) pendant 12j puis 2mg <sup>14</sup> C-FB1/kg d'aliment pendant 12j soit 2,0 $\mu$ Ci		<b>Foie (347dpm, soit 160ng/g)</b> <b>Reins (146dpm, soit 65ng/g)</b>	66
	IV : 0,25 $\mu$ Ci(0,4mgFB1)/kg		<b>Foie : 1076ng/g</b> <b>Rein : 486n/g</b>	65
Singes	IV : 2,33 $\mu$ Ci/kg PV Soit 1,72mgFB1/kg PV	VO : 8,7 $\mu$ Ci/kg PV Soit 6,42mgFB1/kg PV	<b>Foie (IV : 1,92% - VO : 0,64%)</b> <b>Muscle (IV :0,62% - VO : 0,14%)</b> <b>Rein (IV :0,37% - VO : 0,03%)</b>	76
Canard	IP : 10mg/kg PV		<b>Foie : 41,4ng/g</b> <b>Muscle : 1,2ng/g</b> <b>Foie/plasma : 3,13</b> <b>Muscle/plasma : 0,07</b> <b>Foie/muscle : 44</b>	Résultats présentés

### III.5./ Elimination et modélisation

L'élimination de la FB1 chez le canard mulard suit une courbe bi exponentielle correspondant à un modèle à deux compartiments, comme précédemment décrit chez le rat [3, 54], le porc [65], la vache [67], la poule [92] et le singe [80].

Les données disponibles sur l'élimination de la FB1 sont essentiellement les temps de demi-vie. Ils sont établis à partir des courbes de tendances de la représentation en échelle semi-logarithmique (tableau 10).

Dans notre étude, les temps de demi-élimination sont de 64 min dans les deux expérimentations réalisées à la dose de 10mg/kg par voie intra-péritonéale. Ce résultat est, là aussi, en accord avec les publications précédentes établies chez le rat [3, 54], le singe [80] et la poule [92].

**Tableau 10 Temps de demi-élimination de la FB1 .**

Espèce	Type de courbe	T1/2 vie d'élimination	Référence
Rat	Bi-exponentielle	T1/2 $\beta$ = <b>1,1 h</b>	3
		T1/2 $\beta$ = <b>1,03h</b>	54
Singe	Bi-exponentielle	T1/2 $\beta$ = <b>40 min</b>	80
Poule	Bi-exponentielle	T1/2 $\beta$ = <b>48,8 min</b>	92
Porc	Tri-exponentielle	T1/2 $\beta$ = <b>10,5 min</b> T1/2 $\gamma$ = <b>182 min</b>	65
Vache	Bi-exponentielle	T1/2 $\beta$ = <b>16,5 min</b>	67
Canard	Bi-exponentielle	T1/2 $\beta$ = <b>64 min</b>	Résultats présentés

Notons qu'une certaine diversité existe entre les modélisations même si le modèle à deux compartiments est le plus représenté. Les études qui ne décrivent qu'un seul compartiment, pourraient ne décrire que la phase d'élimination du fait d'un dosage plus tardif après l'administration de FB1. Les études qui décrivent trois compartiments visualisent le plus souvent la répartition très précoce et très brève dans un compartiment initial.

## CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de notre étude sont cohérents avec les expérimentations précédemment menées sur les autres espèces monogastriques. En effet, les profils cinétiques, les temps de demi-vie et les rapports tissus/plasma sont semblables. Ainsi la toxicocinétique n'explique pas la plus grande résistance des canards par rapport aux autres espèces monogastriques.

L'absorption et la persistance dans les produits carnés de FB1 chez le canard sont faibles comme pour toutes les autres espèces étudiées. La consommation de ces produits ne devrait donc pas constituer une source d'exposition majeure des consommateurs. Cette hypothèse mérite d'être confirmée par la détection de résidus de FB1 lors d'administration de faibles doses chez le canard, ainsi que lors d'une exposition chronique.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1** Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)- (12/08/2003) Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique. [En ligne], p89-95.  
Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/rapportagri290703.pdf>
- 2** Agence Canadienne d'inspection des aliments- Section des aliments du bétail- CHARMLEY L.L et TRENHOLM H.L.- (21/10/2003) Les mycotoxines, [en ligne].  
Adresse URL : <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebt/quelnew/mycof.shtml>
- 3** ANADON A., MARTINEZ-LARRANAGA M.R., FERNANDEZ-CRUZ M.L., DIAZ M.J, FREJO M.T., FERNANDEZ M.C., MARTINEZ M.A. and MORALES M.E.- Toxicokinetics of fumonisin B<sub>1</sub> in rats.- *Toxicology Letters*, 1996, **88**, 87-88.
- 4** APSIMON J.W. – Structure, synthesis and biosynthesis of fumonisin B<sub>1</sub> and related compounds. – *Environmental Health Perspectives*, 2001, **109**, 245-249.
- 5** BAILLY J-D., BENARD G., JOUGLAR J-Y., DURAND S., GUERRE P.- Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub> in ducks- *Toxicology*, 2001, **163**,11-22 .
- 6** BAILLY J-D ., RAYMOND I., LE BARS P.,GUYOMARD Y., ABADIE J., LE BARS J., GUERRE P., DELVERDIER M. et BURGAT V.- Leucoencéphalomalacie des Equidés. Cas rapportés au CNITV.- *Rev. Med. Vet.*, 1996, **147**, 787-796.
- 7** BEZUIDENHOUT S., GELDERBLOM W., GORST-ALLMAN C., MARASAS W., SPITELLER G. and VLEGGAARD R.- Structure elucidation of the fumonisin, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*.- *J. Chem. Soc. Commun.*, 1988, 743-745.
- 8** BOLGER M., COKER R.D., DiNOVI M., GAYLOR D., GELDERBLOM W., OLSEN M., PASTER N., RILEY R.T., SHEPHARD G. and SPEIJERS G.J.A-FUMONISINS-25/10/2002  
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>
- 9** BONDY G., SUZUKI C., BARKER M., ARMSTRONG C., FERNIE S., HIERLIHY L., ROWSELL P. and MUELLER R.- Toxicity of fumonisin B<sub>1</sub> administered intraperitoneally to male Sprague—Dawley rats.- *Food and Chemical Toxicology* , 1995, **33**, 653-659.
- 10** BROWNIE C.F., CULLEN J.- Characterization of experimentally induced equine leukoencephalomalacia (ELEM) in ponies (*Equus caballus*): preliminary report.- *Vet. Hum. Toxicol.*, 1987, **29**, 34-38.
- 11** CAHAGNIER B., MELCION D., RICHARD-MOLARD D.- Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B<sub>1</sub> on maize grain as a function of different water activities. - *Lett Appl Microbiol.*, 1995, **20**, 247-251.

- 12** CALONI F., SPOTTI M., POMPA G., ZUCCO F., STAMMATI A., De ANGELIS I.- Evaluation of Fumonisin B(1) and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line Caco-2.- *Toxicol.*, 2002, **40**, 1181-1188.
- 13** CASTEEL S.W., TURK J.R and ROTTINGHAUS G.E- Chronic Effects of Dietary Fumonisin on the Heart and Pulmonary Vasculature of Swine.- *Fundamental and Applied Toxicology*, 1994, **23**, 518-524.
- 14** CASTEEL S.W., TURK J.R COWART R.P. and ROTTINGHAUS G.E.- Chronic toxicity of fumonisin in weaning pigs.- *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 413-417
- 15** CAWOOD M.E., GELDERBLOM W.C.A, ALBERTS J.F. and SNYMAN S.D.- Interaction of <sup>14</sup>C-labelled fumonisin B mycotoxins with primary rat hepatocyte cultures.- *Food and Chemical Toxicology*, 1994, **32**, 627-632.
- 16** CHEN J., NIKOLOVA-KARAKASHIAN M., MERRILL A. and MORGAN E.- Regulation of cytochrome P450 2C11 gene expression by interleukine-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes.- *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 25233-25238.
- 17** COLLINS T.F., SHACKLELDFORD M.E., SPRANDO R.L., BLACK T.N., LABORDE J.B., HANSEN D.K., EPPLEY R.M., TRUCKSESS M.W., HOWARD P.C., BRYANT M.A., RUGGLES D.I., OLEJNIK N., RORIE J.I.- Effects of fumonisin B<sub>1</sub> in pregnant rats.- *Food Chem Toxicol*, 1998, **36**, 397-408.
- 18** COLLINS T.F, SPRANDO R.L., BLACK T.N., SHACKLELDFORD M.E., LABORDE J.B., HANSEN D.K., EPPLEY R.M., TRUCKSESS M.W., HOWARD P.C., BRYANT M.A., RUGGLES D.I., OLEJNIK N., RORIE J.I.- Effects of fumonisins in pregnant rats, part 2.- *Food Chem Toxicol*, 1998, **36**, 673-685.
- 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** DANTZER W.R., HOPPER J., MULLIN K., HENDRICH S., MURPHY P.A.- Excretion of (14)C-fumonisin B(1), (14)C-hydrolyzed fumonisin B(1), and (14)C-fumonisin B(1)-fructose in rats.- *J Agric Food Chem.*, 1999, **47**, 4291-4296.
- 21** DBAIBO G., PUSHKAREVA M., JAYADEV S., SCHWARZ J., HOROWITZ J., OBEID L. and HANNUN Y.- Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependant pathway of growth arrest.- *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 1347-1351.
- 22** DUNCAN K., KRUGER S., ZAB E N., KOHN B., PRIOLI R.- Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>.- *Journal of Chromatography A*, 1998, **815**, 41-47.
- 23** DUPUY J.- Principales mycotoxines produites par des souches de *Fusarium* isolées de céréales- Thèse Doct. : Production animale et qualité des denrées., Toulouse INP, 1994, 229p.

- 24** DUTTON M. F.- Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects.- *Pharmacol. Ther.*, 1996, **70**, 137-161.
- 25** EDRINGTON T.S., KAMPS-HOLTZAPPLE C.A., HARVEY R.B., KUBENA L.F., ELISSALDE M.H., ROTTINGHAUS GE.- Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material., *J Anim Sci.*, 1995, **73**, 508-515.
- 26** EDWARDS O.E., BLACKWELL B.A., DRIEGA A.B., BENSIMON C. and APSIMON J.W.- The absolute stereochemistry of the ester functions of fumonisin B1.- *Tetrahedron letters*, 1999, **40**, 4515-4518.
- 27** Internal Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 219.- (15/01/2004), Fumonisin B1 [En ligne].  
Adresse URL: <http://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm>
- 28** ESPADA Y., RUIZ de GOPEGUI R., CUADRADAS C. and CABANES F.J.- Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications.- *Avian Dis.*, 1997, **41**, 73-79.
- 29** FINCHAM J.E., MARASAS W.F., TALIAARD J.J., KRIEK N.P., BADENHORST C.J., GELDERBLOM W.C., SEIER J.V., SMUTS C.M., FABER M., WEIGHT M.J.- Atherogenic effects in a non-human primate of *Fusarium moniliforme* cultures added to a carbohydrate diet.- *Atherosclerosis.*, 1992, **94**, 13-25.
- 30** GELDERBLOM W.C., KRIEK N.P., MARASAS W.F., and THIEL P.G.- Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. – *Carcinogenesis*, 1991, **12**, 1247-1251.
- 31** GELDERBLOM W.C., SNYMAN S.D., ABEL S., LEBEPE-MAZUR S., SMUTS C.M., VAN DER WESTHUIZEN L., MARASAS W.F., VICTOR T.C., KNASMULLER S. and HUBER W.- Hepatotoxicity and -carcinogenicity of the fumonisins in rats. A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans.- *Adv Exp Med Biol*, 1996 **392**, 279-296.
- 32** GELDERBLOM W.C., LEBEPE-MAZUR S., SNIJMAN P.W., ABEL S., SWANEVELDERS., KRIEK N.P. and MARASAS W.F.- Toxicological effects in rats chronically fed low dietary levels of fumonisin B1- *Toxicology*, 2001, **161**, 39-51.
- 33** GULBINS E., BISSONNETTE R., MAHBOUDI A., MARTIN S.- FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway.- *Immunity*, 1995, **2**, 1-20.
- 34** HANNUN Y. and BELL R.- Régulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids.- *Clin. Chim. Acta.*, 1989, **185**, 333-354.
- 35** HENRY M.H., WYATT R.D., FLETCHERT O.J.- The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks- *Poultry science*, 2000, **79**, 1378-1384.



- 36** HO J.A., DURST R.A.- Detection of fumonisin B1: comparison of flow-injection liposome immunoanalysis with high-performance liquid chromatography.- *Analytical Biochemistry*, 2003, **312**, 7-13
- 37** Institut National de Recherche Agronomique (INRA), Sécurité des aliments.- (21/10/2003), Les toxines des moisissures [En ligne] p13-14.  
Adresse URL : <http://www.inra.fr/sia2002/secualim02.pdf>
- 38** JASKIEWICZ K., VAN RENSBURG S.J., MARASAS W.F., GELDERBLOM W.C.- Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats.- *J Natl Cancer Inst.*, 1987, **78**, 321-325.
- 39** JAVED T., RICHARD J.L., BENNETT G.A., DOMBRINK-KURTZMAN M.A., BUNTE R.M., KOELKEBECK K.W., COTE L.M., LEEPER R.W., BUCK W.B.- Embryopathic and embryocidal effects of purified fumonisin B1 or *Fusarium proliferatum* culture material extract on chicken embryos.- *Mycopathologia.*, 1993, **123**, 185-193.
- 40** JECFA, IPCS INCHEM.- (21/10/2003), Fumonisins [En ligne].  
Adresse URL : <http://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>
- 41** KELLERMAN T.S., MARASAS W.F., THIEL P.G., GELDERBLOM W.C., CAWOOD M., COETZER J.A.- Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1.-*Onderstepoort J Vet Res.*, 1990, **57**, 269-275.
- 42** KIM M-Y., LINARNIC C., OBEID L., HANNUN Y.- Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor  $\alpha$  and gamma interferon.- *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 484-489.
- 43** KRIEK N.P., KELLERMAN T.S., MARASAS W.F.- A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats.- *Onderstepoort J Vet Res.*, 1981, **48**, 129-31.
- 44** LABORDE J.B., TERRY K.K., HOWARD P.C., CHEN J.J., COLLINS T.F.X., SHACKELFORD M.E. and HANSEN D.K.- Lack of embryotoxicity of fumonisin B<sub>1</sub> in New Zealand white rabbits.- *Fundam Appl Toxicol*, 1997, **40**, 120-128.
- 45** LE BARS J., LE BARS P., DUPUY J. and BOUDRA H.- Biotic and abiotic factors in Fumonisin B1 production and stability.- *J. AOAC Int.*, 1994, **77**, 517-521.
- 46** LEDOUX D.R., BERMUDEZ A.J., ROTTINGHAUS G.E.- Effects of feeding *fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, in the young turkey poult.- *Poultry Science*, 1996, **75**, 1472-1478.
- 47** MARASAS W.F., KELLERMAN T.S., PIENAAR J.G., NAUDE T.W.- Leukoencephalomalacia: a mycotoxicosis of Equidae caused by *Fusarium moniliforme* Sheldon.- *Onderstepoort J Vet Res.*, 1976, **43**, 113-22.

- 48** MARASAS W.F.O., KRIEL N.P.J., FINCHAM J.E. and VAN RENSBURG S.J.- Primary cancer liver and esophageal cell hyperplasia in rats caused by *Fusarium moniliforme*.- *Int. J. Cancer*, 1984, **34**, 383-387.
- 49** MARASAS W.F., KELLERMAN T.S., GELDERBLOM W.C., COETZER J.A., THIEL P.G., VAN DER LUGT J.J.- Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*.- *Onderstepoort J Vet Res.*, 1988, **55**, 197-203.
- 50** MARASAS W.F.O.- Discovery and occurrence of the fumonisins: a historicalperspective.- *Environmental Health Perspectives*, 2001, **109**, 239-243.
- 51** MARIN S., SANCHIS V., RAMOS A. J. and MAGAN N.- Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology.- *J Food Prot.* 2004, **67**, 1792-1805.
- 52** MARIN S., SANCHIS V., RAMOS A. J. and MAGAN N.- Effect of water activity on hydrolytic enzyme production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* during colonisation of maize.- *International Journal of Food Microbiology*, 1998, **42**, 185-194.
- 53** MARIN S., SANCHIS V., MAGAN N.- Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize.- *Can. J. Microbiol.*, 1995, **41**, 1063-1070.
- 54** MARTINEZ-LARRANAGA M.R., ANADON A., DIAZ M.J., FERNANDEZ-CRUZ M.L., MARTINEZ M.A., FREJO M.T., MARTINEZ M., FERNANDEZ R., ANTON R.M., MORALES M.E. and TAFUR M.- Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B1.- *Vet. Hum. Toxicol.* 1999, **41**, 357-362.
- 55** MARTINEZ-LARRANAGA M.R., ANADON A., DIAZ M.J., FERNANDEZ R.- Induction of cytochrome P4501A1 and P4504A1 activities and peroxisomal proliferation by fumonisin B<sub>1</sub>.- *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, **141**, 185-194.
- 56** MENALDINO D.S., BUSHNEY A., SUN A., LIOTTA D.C., SYMOLON H., DESAI K., DILLEHAY D.L., PENG Q., WANG E., ALLEGOOD J., TROTMAN-PRUETT S., SULLARDS M.C. and MERRILL A.H., Jr .- Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action.- *Pharmacological Research*, 2003, **47**, 373-381.
- 57** MERRILL A., VAN-ECHTEN G., WANG E. and SANDHOFF K.- Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase *de novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*.- *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 27299-27306.
- 58** MEYER K., MOHR K., BAUER J., HORN P., KOVACS M.- Residue formation of fumonisin B1 in porcine tissues.- *Food Addit Contam.*, 2003, **20**, 639-47.
- 59** NELSON P.E., PLATTNER R.D., SHACKELFORD D.D., DESJARDINS A.E.- Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species.- *Appl Environ Microbiol.*, 1992, **58**, 984-989.

- 60** NORRED W.P.- Fumonisin: mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*.- *J. Toxicol. Environ. Health*, 1993, **38**, 309-328.
- 61** NORRED W.P., PLATTNER R.D. and CHAMBERLAIN W.J.- Distribution and excretion of [<sup>14</sup>C]fumonisin B1 in male Sprague-Dawley rats.- *Nat. Toxins*, 1993, **1**, 341-346.
- 62** PAEPENS C., DE SAEGER S., SIBANDA L., BARNA-VETRO I., LEGLISE I., VAN HOVE F., VAN PETEGHEM C.- A flow-through enzyme immunoassay for the screening of fumonisins in maize.- *Analytica Chimica Acta*, 2004, **523**, 229-235.
- 63** PATINO B., MIRETE S., GONZALEZ-JAEN M.T., MULE G., RODRIGUEZ M.T.- PCR detection assay of fumonisin-producing fusarium verticilloides strains.- *J. Food Prot.*, 2004, **67**, 1278-1283
- 64** PRATHAPKUMAR H.S., RAMESH V.B.- Sensitive method for detection of fumonisin B1 in human urine.- *Journal of Chromatography B*, 1998, **705**, 171-173
- 65** PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L. and SAVARD M.E.- Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labelled fumonisin B1 in swine.- *Nat Toxins.*, 1994, **2**, 73-80.
- 66** PRELUSKY D.B., MILLER J.D., TRENHOLM H.L.- Disposition of <sup>14</sup>C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1.- *Food Addit. Contam.*, 1996, **13**, 155-162.
- 67** PRELUSKY D.B., SAVARD M.E. and TRENHOLM H.L.- Pilot study on the plasma pharmacokinetics of fumonisin B1 in cows following a single dose by oral gavage or intravenous administration.- *Nat. Toxins*, 1995, **3**, 389-394.
- 68** RILEY R.T., AN N.H., SHOWKER J.L., YOO H.S., NORRED W.P., CHAMBERLAIN W.J., WANG E., MERRILL A.H. Jr, MOTELIN G., BEASLEY V.R.- Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs.- *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1993, **118**, 105-112.
- 69** ROTTINGHAUS G.E., COATNEY C.E., MINOR H.C.- A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2.- *J Vet Diagn Invest.*, 1992, **4**, 326-329.
- 70** SCHUMACHER J., MULLEN J., SHELBY R., LENZ S., RUFFIN D.C., KEMPPAINEN BW.- An investigation of the role of *Fusarium moniliforme* in duodenitis/proximal jejunitis of horses.- *Vet Hum Toxicol.*, 1995, **37**, 39-45.
- 71** SCOTT P.- Fumonisin.- *Inter. J. Food Microbiol.*, 1993, **18**, 257-270.
- 72** SCOTT P., DELGADO T., PRELUSKY D.B., *et al.*- Determination of fumonisins in milk.- *J Environ Sci Health*, 1994 **B29**, 989-998

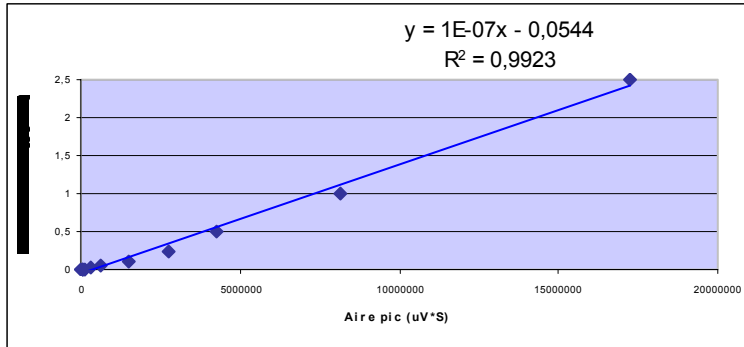
- 73** SHEPHARD G.S., THIEL P.G. and SYDENHAM E.W.- Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B1 in rats.- *Food Chem. Toxicol.*, 1992, **30**, 277-279.
- 74** SHEPHARD G.S., THIEL P. G. and SYDENHAM E. W.- Determination of fumonisin B1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography.- *Journal of Chromatography*, 1992, **574**, 299-304.
- 75** SHEPHARD G.S., THIEL P. G., SYDENHAM E. W., ALBERTS J.F., and GELDERBLOM W.C.A.- Fate of a single dose of the <sup>14</sup>C-labelled mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub>, in rats.- *Toxicon*, 1992, **30**, 768-770.
- 76** SHEPHARD G.S., THIEL P. G. and SYDENHAM E. W. and SAVARD M.E.- Fate of a single dose of 14C-labelled fumonisin B1 in vervet monkeys.- *Nat. Toxins*, 1995, **3**, 145-150.
- 77** SHEPHARD G.S., THIEL P. G. and SYDENHAM E. W. and SNIJMAN P.W.- Toxicokinetics of the mycotoxin fumonisin B2 in rats.- *Fd. Chem. Toxic*, 1995, **33**, 591-595.
- 78** SHEPHARD G.S. and SNIJMAN P.W.- Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate.- *Fd. Chem. Toxic*, 1999, **37**, 111-116.
- 79** SHEPHARD G.S.- Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins- *Journal of Chromatography A*, 1998, **815**, 31-39.
- 80** SHEPHARD G.S., THIEL P.G. and SYDENHAM E.W., ALBERTS J.F., CAWOOD M.E.- Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxine fumonisin B1 in a non-human primate.- *Toxicon*, 1994, **32**, 735-741.
- 81** SHEPHARD G.S., THIEL P.G., SYDENHAM E.W. and ALBERTS J.F.- Biliary excretion of the mycotoxin fumonisin B1 in rats.- *Food and Chemical Toxicology*, 1994, **32**, 5, 489-491.
- 82** SMITH J.S. and THAKUR R.A.- Occurrence and fate of fumonisins in beef.- *Adv Exp Med Biol*, 1996, **392**, 39-55.
- 83** SPOTTI M., CALONI F., FRACCHIOLLA I., POMPA G., VIGO D., MAFFEO G.- Fumonisin B1 carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder.- *Vet. Hum. Toxicol.*, 2001, **43**, 109-111.
- 84** SYDENHAM E. W., SHEPARD G. S. and THIEL P. G.- Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds.- *Journal of AOAC international*, 1992, **75**, 313-318.
- 85** SUZUKI C.A.M., HIERLIHY L., BARKER M., CURRAN I., MUELLER R. and BONDY G.S. - The Effects of Fumonisin B<sub>1</sub> on Several Markers of Nephrotoxicity in Rats.- *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995, **133**, 207-214

- 86** TARDIEU D., BAILLY J.D., BENARD G., TRAN T.S., GUERRE P.- Toxicity of maize containing known levels of fumonisin B1 during force-feeding of ducks.- *Poult Sci.*, 2004, **83**, 1287-1293.
- 87** TRAN S.T., BAILLY J.D., TARDIEU D., DURAND G., BENARD G., GUERRE P.- Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks.- *Chemico-Biological Interactions*, 2003, **146**, 61-72.
- 88** VELASQUEZ C., LLOVERA M., PLANA J., CANELA R.- Effect of solvents on the fumonisins analysis by high-performance liquid chromatography with AccQ.Fluor as derivatizing reagent.- *Journal of Chromatography A*, 2000, **870**, 469-472.
- 89** VISCONTI A., DOKO MB., BOTTALICO C., SCHURER B., BOENKE A.- Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution.- *Food Addit Contam.*, 1994, **11**, 427-31
- 90** VISCONTI A., MARASAS W.F.O., MILLER J.D., RILEY R.- (21/10/2003) Fumonisin, [En ligne] task3 .  
Adresse URL :  
[http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/items/5\\_taskgroupnews.htm](http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/items/5_taskgroupnews.htm)
- 91** VOSS K.A., BACON C.W., NORRED W.P., CHAPIN R.E.- Studies on the reproductive effects of *Fusarium moniliforme* culture material in rats and the biodistribution of [<sup>14</sup>C]fumonisin B<sub>1</sub> in pregnant rats.- *Nat Toxins*, 1996, **4**, 24-33.
- 92** VUDATHALA D.K., PRELUSKY D.B., AYROUD M., TRENHOLM H.L. and MILLER J.D.- Pharmacokinetic fate and pathological effects of <sup>14</sup>C-fumonisin B1 in laying hens. -*Nat. Toxins*, 1994, **2**, 81-88.
- 93** WANG E., NORRED W., BACON C., RILEY R.T. and MERRILL A.H.- Inhibition of sphingolipids biosynthesis by fumonisins; implications for disease associated with *Fusarium moniliforme*.- *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 1706-1716.
- 94** WEIBKING T.S., LEDOUX D.R., BROWN T.P. and ROTTINGHAUS G.E.- Fumonisin toxicity in turkey poults.- *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 75-83.
- 95** WILSON T.M., NELSON P.E., KNEPP C.R.- Hepatic neoplastic nodules, adenofibrosis, and cholangiocarcinomas in male Fisher 344 rats fed corn naturally contaminated with *Fusarium moniliforme*.- *Carcinogenesis*, 1985, **6**, 1155-1160.

# ANNEXES

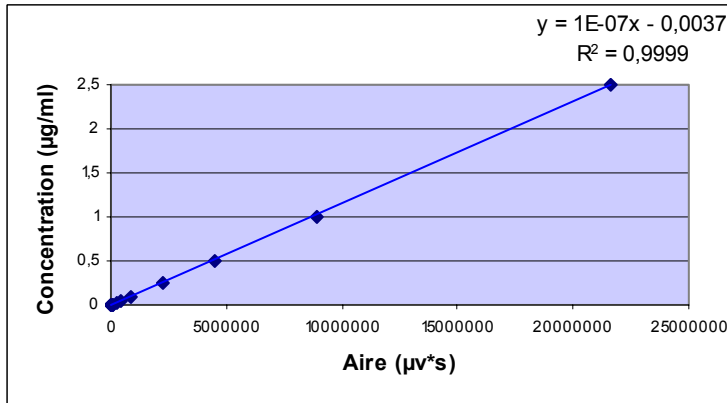
## Annexe 1

GAMME DU 07/10/2003



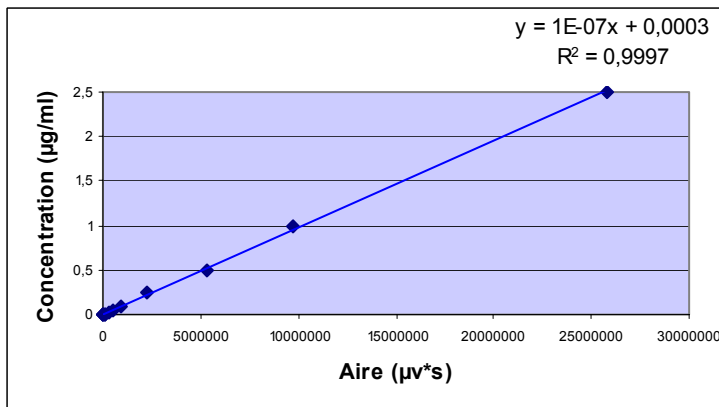
Aire pic	µg/ml
26272	0
52554	0,001
91550	0,005
126814	0,01
321845	0,025
642016	0,05
1535570	0,1
2727774	0,25
4282240	0,5
8123908	1
17247526	2,5

GAMME DU 17/10/2003



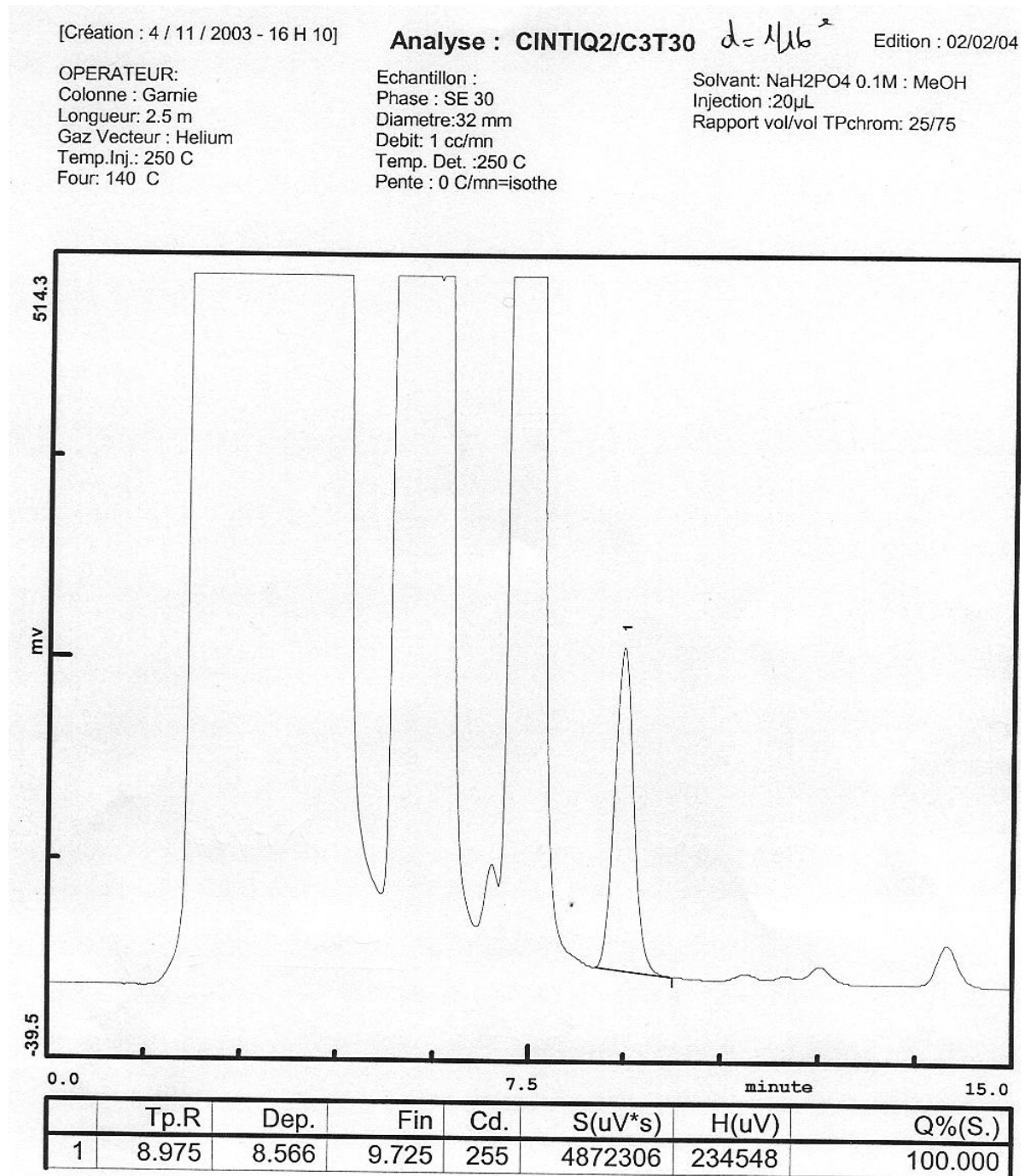
Aire	µg/ml
14216	0
24076	0,001
44441	0,005
71582	0,01
226505	0,025
438206	0,05
834182	0,1
2249072	0,25
4459765	0,5
8880289	1
21603950	2,5

GAMME DU 28/10/2003



Aire	µg/ml
13989	0
19029	0,001
30136	0,0025
54026	0,005
108189	0,01
268012	0,025
546094	0,05
906979	0,1
2283506	0,25
5353475	0,5
9705705	1
25800895	2,5

Annexe 2



Chromatogramme type obtenu après analyse d'un sérum d'un animal ayant reçu 10mgFB1/kg par voie intra-péritonéale.

### Annexe 3

[Création : 6 / 1 / 2004 - 16 H 39]

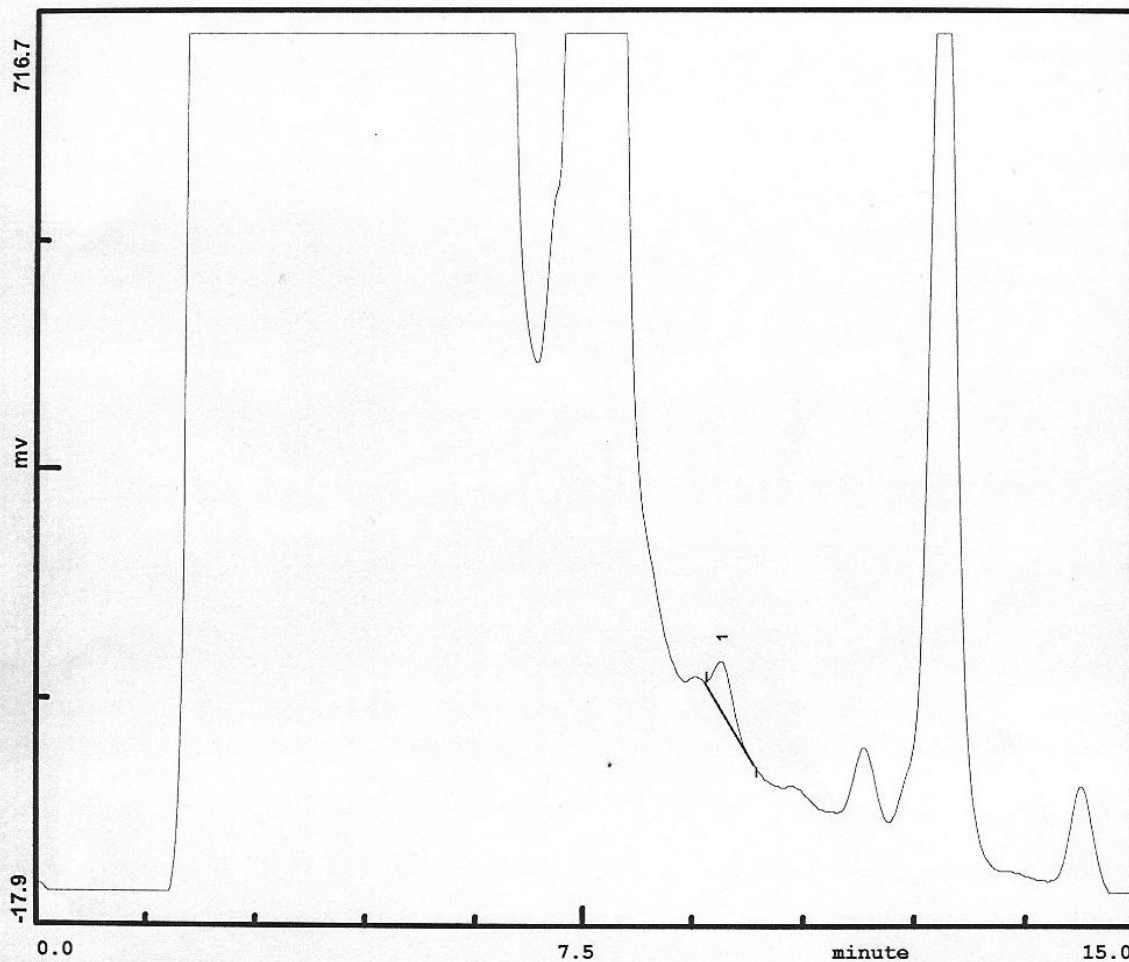
**Analyse : FBTISSUS/MC9t60b**

Edition : 14/01/04

OPERATEUR:  
Colonne : Garnie  
Longueur: 2.5 m  
Gaz Vecteur : Helium  
Temp.Inj.: 250 C  
Four: 140 C

Echantillon :  
Phase : SE 30  
Diametre:32 mm  
Debit: 1 cc/mn  
Temp. Det. :250 C  
Pente : 0 C/mn=isothe

Solvant: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M : MeOH  
Injection :20µL  
Rapport vol/vol TPchrom: 25/75



	Tp.R	Dep.	Fin	Cd.	S(uV*s)	H(uV)	Q%(S.)
1	9.383	9.183	9.841	255	682071	39136	100.000

Chromatogramme type obtenu après analyse d'un échantillon de muscle d'un animal ayant reçu 10mgFB1/kg par voie intra-péritonéale.



# Annexe 4

[Création : 18 / 12 / 2003 - 10 H 36]

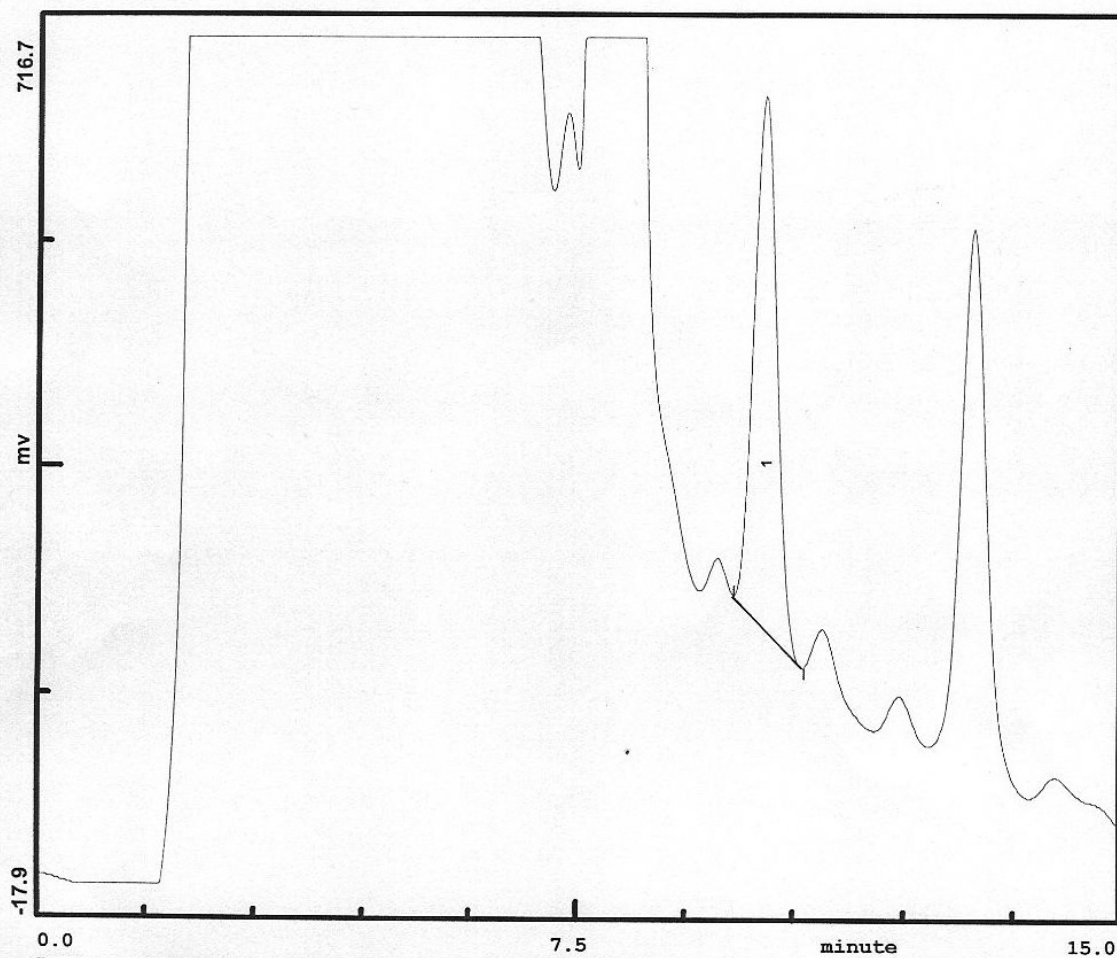
Analyse : **FBTISSUS/fo2I8T30**

Edition : 14/01/04

OPERATEUR:  
Colonne : Garnie  
Longueur: 2.5 m  
Gaz Vecteur : Helium  
Temp.Inj.: 250 C  
Four: 140 C

Echantillon :  
Phase : SE 30  
Diametre:32 mm  
Debit: 1 cc/mn  
Temp. Det. :250 C  
Pente : 0 C/mn=isothe

Solvant: NaH2PO4 0.1M : MeOH  
Injection :20µL  
Rapport vol/vol TPchrom: 25/75



	Tp.R	Dep.	Fin	Cd.	S(uV*s)	H(uV)	Q%(S.)
1	10.075	9.658	10.616	255	9986421	452966	100.000

Chromatogramme type obtenu après analyse d'un échantillon de foie d'un animal ayant reçu 10mgFB1/kg par voie intra-péritonéale.

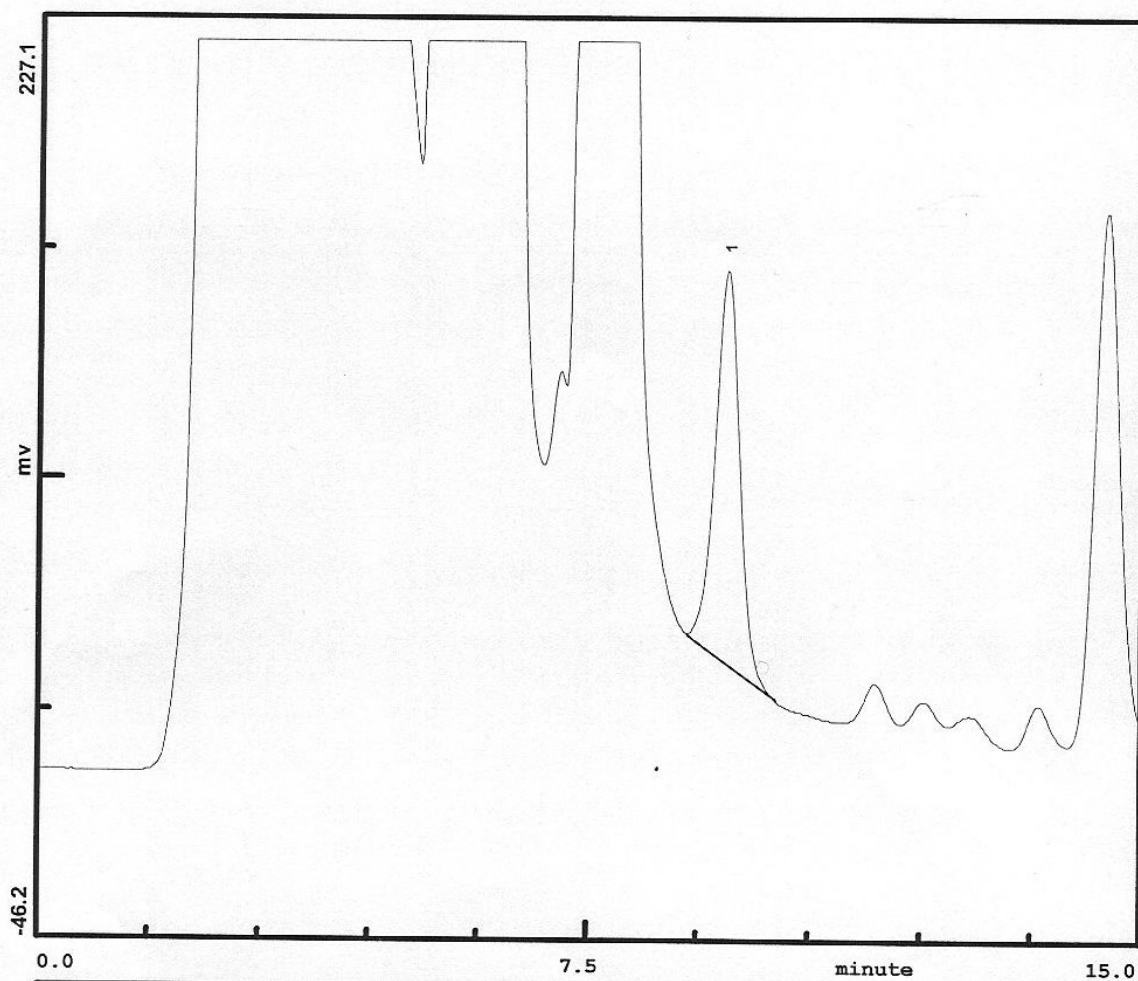
# Annexe 5

[Création : 25 / 11 / 2003 - 14 H 44] **Analyse : CINTIQ2/VOC2T1v5** *d 1/5* Edition : 02/02/04

OPERATEUR:  
Colonne : Garnie  
Longueur: 2.5 m  
Gaz Vecteur : Helium  
Temp.Inj.: 250 C  
Four: 140 C

Echantillon :  
Phase : SE 30  
Diametre:32 mm  
Debit: 1 cc/mn  
Temp. Det. :250 C  
Pente : 0 C/mn=isothe

Solvant: NaH2PO4 0.1M : MeOH  
Injection :20µL  
Rapport vol/vol TPchrom: 25/75



	Tp.R	Dep.	Fin	Cd.	S(uV*s)	H(uV)	Q%(S.)
1	9.375	8.858	10.041	255	2815131	122120	100.000

Chromatogramme type obtenu après analyse d'un sérum d'un animal ayant reçu 160mgFB1/kg par voie orale.