
DÉTERMINATION DE LA FUMONISINE B1 CHEZ LE CANARD APRÈS EXPOSITION À DE FAIBLES DOSES

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

Anne-Gaëlle, Géraldine DEPOIRE

Née, le 28 février 1979 à SAINT-AVOLD (Moselle)

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 : DEPOIRE

PRENOM: Anne-Gaelle

TITRE : **Détermination de la Fumonisine B1 chez le canard après exposition à de faibles doses.**

RESUME :

20 canetons mulards ont reçu par voie orale des doses de FB1 de 0 à 24 mg FB1/kg PV en vue de déterminer la présence de résidus de cette toxine lors d'exposition à de faibles doses. Sang, foie et muscles ont été collectés 2 heures après gavage. La FB1 a été déterminée par HPLC après adaptation de la norme AFNOR NF EN 13585 utilisée pour la recherche de la toxine dans le maïs. Les résultats obtenus révèlent une limite de détection dans le muscle et le plasma de 4 µg/kg et de 4 µg/l. Dans le foie, cette LD est de 50µg/kg. Les LD élevées associées à une faible biodisponibilité de la FB1 par voie orale ne permettent pas sa détermination lors d'exposition à des doses inférieures à 10 mg/kg PV.

MOTS-CLE : Fumonisine B1 – résidus - toxicocinetique – HPLC – fluorimétrie – canetons – plasma – foie - muscle

ENGLISH TITLE : **Fumonisin B1 determination in ducks after low doses exposure.**

ABSTRACT :

In order to determine the presence of FB1 residues after low doses exposure, 20 ducklings have been administrated solutions of 0 to 24 mg FB1/kg bw by gavage. Blood, liver and muscle samples were collected 2 hours post gavage. We adapted the HPLC method used to determine FB1 in corn by the AFNOR. Our results indicate that detection limits in muscle and plasma are 4µg/kg and 4µg/l. In liver the detection limit is 50µg/kg. These high detection limits associated to FB1 low biodisponibility following oral route don't allow determining it for contaminant doses lowers than 10 mg/kg.

KEY-WORDS: Fumonisin B1- Residues- Toxicokinetics – HPLC – Fluorimetry – duckling – plasma – liver - muscle.

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. GUELF
	M.	M. ECKHOUTTE

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

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

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

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

PROFESSEURS 2^e CLASSE

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

PROFESSEUR ASSOCIE

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

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 **PRYMENKO 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*

Table des matières

I. Introduction générale.....	11
II. Etude bibliographique.....	17
II.1. Toxicocinétique.....	17
II.1.1. Passage membranaire.....	17
II.1.2. Absorption.....	17
II.1.2.1. Mammifères monogastriques.....	18
II.1.2.2. Mammifères polygastriques.....	18
II.1.2.3. Volailles.....	19
II.1.3. Distribution.....	19
II.1.3.1. Mammifères monogastriques.....	19
II.1.3.2. Mammifères polygastriques.....	21
II.1.3.3. Volailles.....	22
II.1.4. Métabolisme.....	22
II.1.5. Elimination.....	23
II.1.5.1. Mammifères monogastriques.....	23
II.1.5.2. Mammifères polygastriques.....	25
II.1.5.3. Volailles.....	25
II.2. Méthodes analytiques des fumonisines	26
II.2.1. Echantillonnage, homogénéisation.....	29
II.2.2. Extraction.....	29
II.2.3. Purification	29
II.2.3.1. SAX.....	30
II.2.3.2. C18.....	30
II.2.3.3. Colonnes à immunoaffinité.....	31
II.2.3.4. Purification des échantillons d'origine animale.....	31
II.2.4. Dérivatisation.....	32
II.2.5. Détection, quantification.....	32
II.2.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	33
II.2.5.2. Chromatographie gazeuse (CG).....	33
II.2.5.3. Chromatographie liquide haute pression (HPLC).....	34
II.2.5.3.1. HPLC/ Fluorométrie.....	34
II.2.5.3.2. HPLC/ Spectrométrie de masse.....	36
II.2.5.3.3. HPLC/ Evaporative light scattering detection.....	38
II.2.5.4. Electrophorèse capillaire.....	38

II.2.5.5. Techniques ELISA.....	39
II.2.5.6. Autres techniques associées étudiées	39
II.2.6. Adaptation aux matrices carnées.....	39
II.2.7. Etude comparative des techniques analytiques.....	41
III. Etude Expérimentale.....	43
III.1. Matériel	43
III.2. Réactifs et produits chimiques.....	44
III.3. Animaux.....	45
III.3.1. Prélèvement des échantillons.....	45
III.3.2. Traitement des échantillons.....	46
III.4. Résultats-Discussion	49
III.4.1. Validation de la méthode chromatographique.....	49
III.4.2. Méthode de calcul	49
III.4.3. Standards et gammes.....	49
III.3.4. Limites de détection et de quantification.....	50
III.3.5. Données obtenues sur les plasmas.....	51
III.3.6. Données obtenues sur le foie.....	52
III.3.7. Données obtenues sur le muscle.....	54
III.3.8. Répartition de la FB1 dans les différentes matrices.....	55
IV. Conclusion et perspectives.....	56
Bibliographie.....	58

Liste des illustrations

Figure 1 :.....	11
Structure des fumonisines.	
Figure 2 :.....	12
La FB1 un analogue structural de la sphingosine.	
Figure 3 :.....	13
Voies de biosynthèse des sphingolipides.	
Figure 4 :.....	46
Représentation schématique du protocole de détermination de FB1 dans le plasma.	
Figure 5 :	47
Représentation schématique du protocole de détermination de FB1 dans le foie.	
Figure 6 :	48
Représentation schématique du protocole de détermination de FB1 dans le muscle.	
Figure 7	50
Représentation graphique des gammes de FB1.	
Figure 8 :.....	51
Représentation graphique des surfaces mesurées sur les échantillons de plasma en fonction des doses réelles administrées.	
Figure 9	53
Représentation graphique des surfaces mesurées sur les échantillons de muscle en fonction des doses réelles administrées.	
Figure 10 :	54
Représentation graphique des surfaces mesurées sur les échantillons de foie en fonction des doses réelles administrées.	

Liste des tableaux

Tableau I :.....	27
Méthodes de dosage des fumonisines.	
Tableau II :.....	45
Doses théoriques et réelles de FB1 administrées.	
Tableau III :.....	49
Gammes de FB1.	
Tableau IV :.....	51
Données obtenues sur le plasma.	
Tableau V :.....	52
Données obtenues sur le foie.	
Tableau VI :.....	54
Données obtenues sur le muscle.	
Tableau VII :.....	55
Concentrations de FB1 déterminées dans le plasma, le foie et le muscle.	

Liste des abréviations

AccQ.Fluor : 6-aminoquinoyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate	IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
ACN : Acétonitrile	IP: Intrapéritonéal
ALAT : Alanine Amino Transférases	IV : Intra Veineux
AOAC Int.: Association of Official Analytical Chemists International	KCl : Chlorure de potassium
ASAT : Aspartate Amino Transférases	KCN : Cyanure de potassium
AW: Activité en eau	KOH : Potasse
Bq : Becquerel	LD : Limite de détection
CaCo : lignée cellulaire de cancer du colon humain	LLC-PK1 : cellules épithéliales de rein de porc
CCM : Chromatographie sur Couches Minces	LQ : Limite de quantification
CG : Chromatographie Gazeuse	MeOH : Methanol
CV : Coefficient de Variation	MS : Spectrométrie de masse
DBD : 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole	M/z : Mass/ Signal
EC : Electrophorèse capillaire	NBDF : 4-fluoro-7-Nitrobenzofurazan
EDTA : Ethylène Diamine Tetraacetic Acid	Nd : Non déterminé
ELEM : Leuco Encéphalomalacie Equine	OPA : Ortho-phtaldialdéhyde
ELISA : Liquid Immunosorbent Assay	PAL : Phosphatases Alcalines
ELSD: Evaporative Light Scattering Detection	pH : Potentiel hydrogène
ENVN: Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	PV : Poids vif
EtOH: Ethanol	Pdt : Pendant
ES : Electropray	Po : Per os
FAB : Fast Atom Bombardment	Ppm : Partie par million
FAO : Food and Agriculture Organisation	pHFB1 : FB1 partiellement hydrolysée
FB1: Fumonisine B1	Sa : Sphinganine
FB2: Fumonisine B2	SAX: Strong Anion Exchange
FDA: Food and Drug Administration	SPE: Solid Phase Extraction
FID: Flame Ionisation Detection	So: Sphingosine
FITC: isothiocyanate de fluoresceine	Std: Standard
FMOC: 9-fluorenylméthyl-chloroformate	SV: Ecart type
GGT: Gamma Glutamyl Transférases	TS: Thermospray
H : Heure	T1/2 α : Temps de demi vie α correspondant à l'absorption
HFB1 : Hydroxy-FB1	T1/2 β : Temps de demi vie β correspondant à l'élimination
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression	T1/2 γ : Temps de demi vie γ correspondant à l'excrétion
IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer	UPSP : Unité Propre à Soutien de Programme
	UV: Ultra Violet
	WHO: World Health Organisation
	14C-FB1: FB1 marquée au Carbone 14

I. Introduction générale

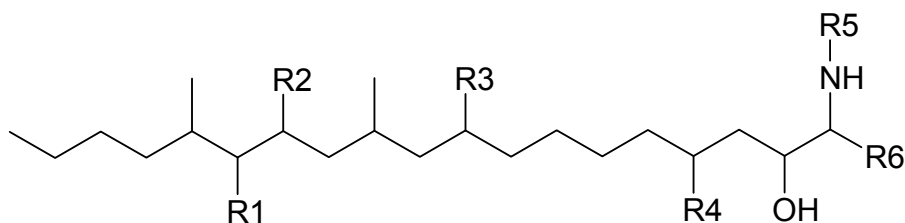
Les mycotoxines sont des toxines issues du métabolisme secondaire de moisissures. Ces moisissures peuvent se développer sur les céréales au champ ou lors du stockage. Les grains contaminés perdent en qualité et peuvent être à l'origine de mycotoxicoses. 25% des denrées alimentaires seraient ainsi contaminées par les mycotoxines. Parmi les mycotoxines importantes en France, les fumonisines constituent un sujet préoccupant. Elles sont abondantes dans le maïs, 30% des lots produits dépassent les proportions de limites réglementaires. Ces composés sont produits par *Fusarium verticilloïdes*, isolé sur les 5 continents [1].

Leur structure chimique a été élucidée en 1988, ce sont des isomères du 2S-amino-12S,16R-diméthyl-3S,5R,10R,14S,15R-penta-hydroxy-eicosane.

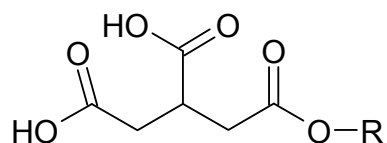
Les groupements hydroxyl en C14 et C15 sont estérifiés par un groupe carboxyl terminal de l'acide propane-1,2,3-tricarboxylique. A l'heure actuelle 15 fumonisines sont connues et regroupées dans 4 catégories : FA1, FA2, FA3, FAK1 ; FB1, FB2, FB3, FB4 ; FC1, FC2, FC3, FC4 ; FP1, FP2, FP3. La fumonisine la plus abondante et la plus toxique est la FB1 (Figure 1).

Figure 1 : structure des fumonisines :

Structure générale des fumonisines :



Acide Tricarboxylique (ATC) :



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
FB1	ATC	ATC	OH	OH	H	CH3
FB2	ATC	ATC	H	OH	H	CH3
FB3	ATC	ATC	OH	H	H	CH3
FB4	ATC	ATC	H	H	H	CH3
FC1	ATC	ATC	OH	OH	H	H
FC2	ATC	ATC	H	OH	H	H
FC3	ATC	ATC	OH	H	H	H
FC4	ATC	ATC	H	H	H	H
HFB1	OH	OH	OH	OH	H	CH3

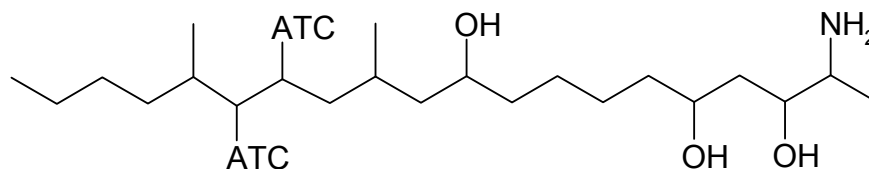
Les fumonisines sont également solubles dans une solution d'acétonitrile-eau (ACN-H₂O) ou dans le méthanol (MeOH). Elles sont stables dans le mélange ACN-H₂O (1 /1) 6 mois à 25°C. Les températures atteintes lors des transformations de la matière première ne les détruisent pas. Elles sont stables à la lumière.

Les dérivés partiellement hydrolysés (pHFB1) et hydrolysés (aminopentol ou HFB1) sont issus de la perte d'un ou deux acides tricarboxyliques. Ils sont donc moins polaires.

La structure de ces mycotoxines est très proche de celle de la sphingosine (figure 2), ce qui est pour partie responsable de leur mode d'action. En effet, elles interviennent dans les voies de biosynthèse des sphingolipides par inhibition de l'activité céramide synthétase (Figure 3).

Figure 2 : La FB1, un analogue structural de la sphingosine

Fumonisine B1 :



Sphingosine :

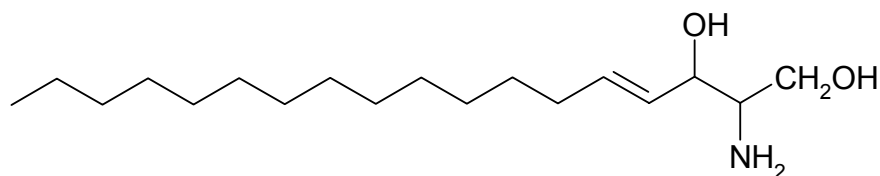
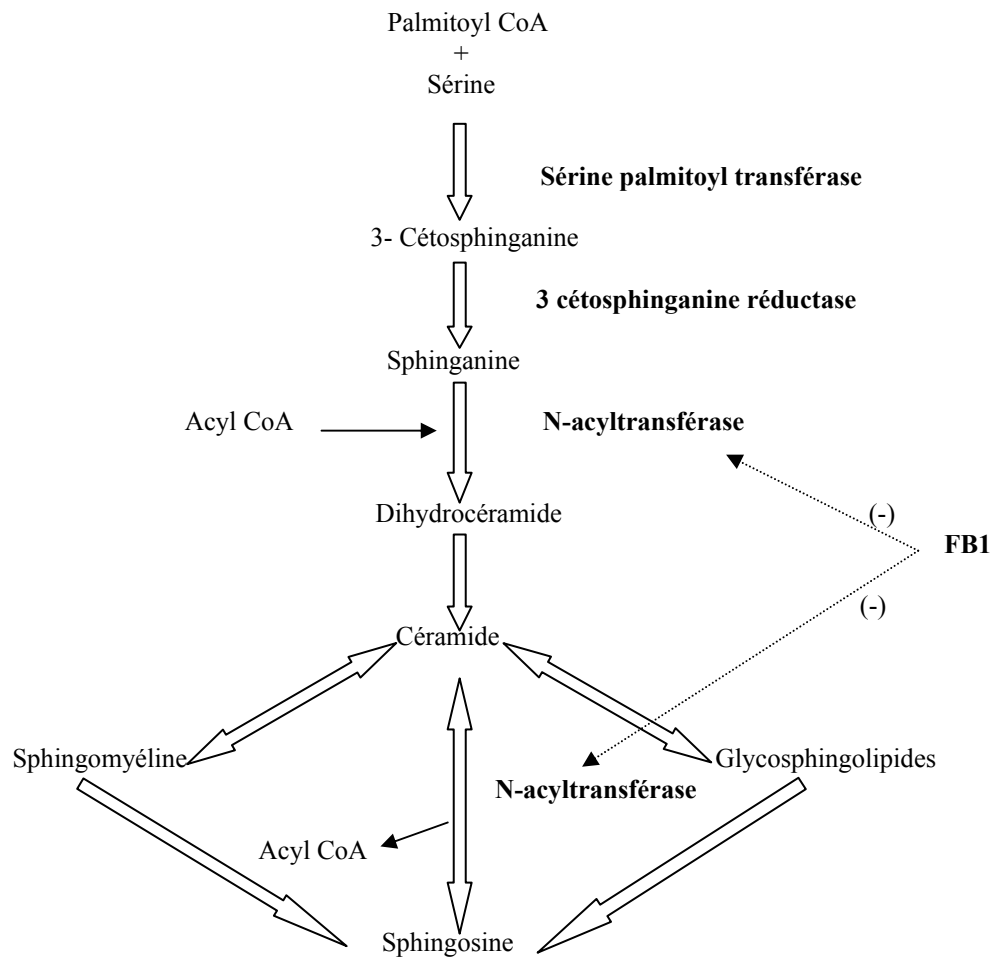


Figure 3 : Voies de biosynthèse des sphingolipides :



D'après [25] .

Cette inhibition est compétitive. La FB1, par sa portion « sphinganine-like », pourrait se lier à l'enzyme. Cela provoque une augmentation de la sphinganine libre et une diminution de la sphingosine libre soit une augmentation du ratio sphinganine libre/ sphingosine libre. Ce ratio sert de marqueur d'exposition aux fumonisines [7]. Les bases sphingoïdes et les céramides agissent au niveau de la transcription de certains gènes et modulent l'activation de protéines cellulaires. Les fonctions biologiques telles que l'apoptose, la croissance, la différenciation cellulaire, l'inflammation, la sécrétion des protéines, l'endocytose, la synthèse d'autres classes de sphingolipides, font appel aux bases sphingoïdes. D'autre part, les fumonisines bloquent les courants calciques et réduisent l'amplitude de tension maximale du muscle cardiaque [7].

La nature de la fumonisine influence sa cytotoxicité : une étude comparative entre les fumonisines et leurs dérivés hydrolysés sur 3 lignées cellulaires différentes a montré que les aminopolyols sont cytotoxiques alors que, parmi les fumonisines, seules les

fumonisin B sont toxiques [2]. La nature de la cellule influence aussi la cytotoxicité. Par exemple, *in vitro*, la FB1 provoque sur les macrophages aviaires une diminution de l'activité phagocytaire, des altérations morphologiques, une désintégration du noyau et/ou une vacuolisation du cytoplasme [3]. Sur les cellules endothéliales des artères pulmonaires de porc, elle augmente la perméabilité des vaisseaux [4].

Les mycotoxicoses induites par la FB1 s'expriment par des symptômes différents selon les espèces touchées.

La leucoencéphalomalacie équine (ELEM) a été une des premières mycotoxicoses découverte liée aux fumonisines. La survenue de cette affection a pu être mise en relation avec la consommation de maïs contaminé par les fumonisines. La substance blanche du système nerveux central présente des lésions de liquéfaction correspondant à une diminution de la teneur en sphingomyélines des membranes cellulaires [5]. La barrière endothéliale des vaisseaux du cerveau de chevaux atteints est aussi plus perméable et présente des oedèmes périvasculaires [4]. Ceci correspondrait à un stade initial de leucoencéphalomalacie. La reproduction expérimentale des intoxications est possible. Des doses comprises entre 1 et 4 mg/kg PV, administrées per os en 20 doses sur 29 jours, provoquent l'apparition des symptômes [3].

Chez les suidés, l'intoxication se manifeste par l'apparition d'oedèmes pulmonaires (oedème pulmonaire porcine PPE), associés ou non à un hydrothorax. A l'autopsie, les poumons présentent une consistance modifiée et une lobulation plus marquée. Expérimentalement, une administration de 4,2 mg/kg PV par jour per os pendant 14 jours a permis de reproduire l'oedème pulmonaire [3]. *In vitro*, la FB1 provoque une accumulation de sphinganine libre et une augmentation de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales pulmonaires du porc [3]. *In vivo*, des agrégats membranaires dans le cytoplasme des macrophages intravasculaires des poumons sont observés. L'activation de ceux-ci par relargage de substances vasoactives pourrait être à l'origine de l'oedème pulmonaire porcine [3].

Toutes les espèces étudiées présentent des signes de toxicité hépatique caractérisée par l'augmentation des paramètres biochimiques : Phosphatases Alcalines (PAL), Alanine Amino Transférases (ALAT), Aspartate Amino Transférases (ASAT), Gamma Glutamyl Transférases (GGT) et Cholestérol. L'aspect macroscopique du foie est modifié. On note une augmentation de la taille et un éclaircissement. *In vitro*, sur des cultures primaires de cellules d'hépatocytes de rat, l'inhibition de la biosynthèse des sphingolipides a été mise en évidence [6]. La cytotoxicité hépatique et les altérations biochimiques n'ont pas été mises en relation.

Une toxicité rénale est également observée. Elle se caractérise par une dégénérescence de l'épithélium tubulaire des reins de cheval, porc, rat, ovin.

Des problèmes d'athérosclérose chez le singe ou l'homme sont rapportés. Des effets immunosuppresseurs chez les volailles sont signalés. Des hémorragies cérébrales sont relatées chez les lapins [1].

Chez les polygastriques, seules des doses très fortes permettent de retrouver expérimentalement les effets toxiques des fumonisines. L'administration quotidienne de 22,2 mg/kg PV pendant 4 jours per os chez des agneaux ne provoque que de faibles diarrhées et une léthargie passagère. Néanmoins, en augmentant les doses (45,5 mg/kg PV pendant 4 jours), les agneaux finissent par mourir d'insuffisance rénale aiguë entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour [3]. Les bovins sont peu sensibles par rapport à toutes les autres espèces. Des administrations de doses croissantes sur de longues périodes ne provoquent pas de modifications significatives des paramètres biochimiques [3].

Le taux de cancers de l'œsophage dans l'espèce humaine est fort dans certaines régions d'Afrique du sud, d'Italie, des USA, de Chine et d'Iran [1]. Ce taux élevé serait corrélé à la consommation importante de produits contaminés par les fumonisines. La différence de contamination serait d'autant plus importante que les individus appartiennent à des pays développés ou en voie de développement. Les classes sociales les plus défavorisées semblent être les plus touchées car leur alimentation est essentiellement à base de maïs. Par ailleurs, l'influence d'autres paramètres dans l'émergence de ces cancers de l'oesophage n'a pas été évaluée [1].

L'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé les fumonisines dans la classe 2B des molécules carcinogènes. Cette classification fait suite aux doutes émis concernant leur implication dans le développement du cancer de l'oesophage [8].

En 2004, un rapport sur la législation des fumonisines dans les aliments a été publié [9]. Il suggère que la mise en place d'un accord international concernant la législation des fumonisines est essentielle pour protéger la santé publique. Des comités scientifiques européens évaluent depuis plusieurs années la toxicité des fumonisines en vue de trouver des normes. A l'heure actuelle, les recommandations de la commission européenne proposent un taux maximal de 2 mg/kg dans le maïs brut et de 0,1 mg/kg dans les aliments pour les enfants pour FB1 plus FB2. Dans certains pays, des limites maximales pour les aliments des espèces sensibles ont été fixées. Par exemple, ces limites sont de 5 mg/kg pour les chevaux et 50 mg/kg pour les cochons. L'office fédéral de santé publique suisse a posé la limite à 1mg/kg pour les FB1 et FB2 dans le maïs destiné à la consommation humaine. La food and drugs administration a proposé un taux maximum de

fumonisines de 2 à 4 mg/kg dans l'alimentation humaine et de 5 à 100 mg/kg dans l'alimentation animale en 2001 [9].

Les méthodes d'analyse sont en pleine évolution. Nous étudierons plus en détails les techniques d'analyse dans notre développement.

Les recherches dans les matrices d'origine animale sont adaptées à partir de méthodes mises au point sur les matrices végétales, pour lesquelles existent des normes. Des études de toxicocinétique ont été effectuées chez les rongeurs, les primates non humains, les suidés, les volailles et les ruminants. Un grand nombre de ces études a été fait avec des fumonisines radio-marquées au carbone 14 ou après utilisation de fortes doses.

Des travaux antérieurs dans le laboratoire ont également précisé la toxicocinétique de la FB1 chez le canard après administration de fortes doses.

L'objectif de notre travail est de déterminer la plus petite dose de fumonisines détectable et quantifiable dans le plasma, le muscle et le foie. Nous utilisons une technique HPLC avec détection par fluorométrie d'échantillons dérivatisés à l'O-phthaldialdéhyde dérivée de la norme AFNOR NF EN 13585.

II. Etude bibliographique

II.1.Toxicocinétique.

La plupart des travaux ont été fait sur le les animaux de laboratoire, le porc, le singe, les volailles et les vaches, grâce au marquage au carbone 14 (^{14}C -FB1) de la FB1, sur les carbones 21 et 22 [10]. La biosynthèse des fumonisines radiomarquées utilise la L-[méthyl- ^{14}C] méthionine.

Chez les animaux de laboratoire, les fumonisines sont peu absorbées lorsque la contamination se fait par voie orale. Elles sont rapidement éliminées de la circulation. On les retrouve dans les fécès sous forme non métabolisée. L'excrétion biliaire est plus importante que l'excrétion urinaire mais on retrouve de la FB1 dans les reins chez toutes espèces. Un cycle entéro-hépatique semble être observé chez le porc. Chez certains primates non humains et ruminants, elles peuvent être métabolisées dans l'intestin en dérivés partiellement hydrolysés (pHFB1) ou hydrolysés (HFB1).

II.1.1. Passage membranaire

Des expérimentations *in vitro* sur souche de cellules de cancer du colon humain CaCo-2 ont été réalisées. Des cellules ont été mises en culture avec de la FB1, de la pHFB1 et de la HFB1. Le but est d'étudier l'absorption intestinale de la toxine et de ses métabolites produits lors de certains traitements du maïs, ou par action de la flore. A la fin des expériences, la HFB1 a été retrouvée dans les cellules alors que la FB1 n'avait pas été absorbée [11]. L'explication d'un tel phénomène se trouve peut être dans le fait que la HFB1 ne possède pas de chaîne d'acide tricarboxylique et que l'absence de celle-ci rend le métabolite moins polaire et donc plus à même de traverser les membranes cellulaires [12].

II.1.2 Absorption

Les absorptions transcutanée et par inhalation ne sont pas documentées. Les quantités de fumonisines retrouvées dans le plasma après contamination par voie orale chez le porc, la poule pondeuse, le singe vervet, la vache laitière et le rat sont

très faibles. L'accumulation de ^{14}C -FB1 dans les tissus chez le rat est également très faible, ce qui suggère une absorption faible. La biodisponibilité des fumonisines est faible dans toutes les espèces et quasi nulle chez les ruminants.

II.1.2.1. Mammifères monogastriques :

-le rat :

Lors d'ingestion de ^{14}C -FB1, la totalité de la radioactivité se retrouve dans les selles sous forme non métabolisée [13]. Par ailleurs, 24 heures suivant un gavage, seul 0,2 % de radioactivité est retrouvé dans la bile [10]. L'absorption est donc faible au niveau du tractus digestif : 3,5% [26].

-le porc :

Des porcs en croissance ont été nourris avec un aliment contaminé avec 3,0 mg de ^{14}C -FB1 /kg d'aliment du jour 1 au jour 12, puis 2,0 mg de ^{14}C -FB1/kg d'aliment les jours 13 à 24, puis ils ont reçu une alimentation exempte de toute trace de FB1 pendant 9 jours. Des résidus sont trouvés dans le foie et les reins. La quantité absorbée est estimée entre 3 et 6% [14].

-Le singe :

Des singes vervets ont reçu par voie orale 6,42 mg de ^{14}C -FB1 /kg PV. Les doses de FB1 détectées dans le plasma indiquent que seule une petite quantité est absorbée. Le pic de concentration plasmatique à 1-2 heures est en dessous de 210 ng/ml [15].

II.1.2.2. Mammifères polygastriques :

Deux vaches ont reçu par voie orale 1,0 et 5,0 mg FB1/kg PV. Aucune trace de fumonisine ou de ses métabolites n'est trouvée dans le plasma au cours des 12 heures suivant l'administration. D'autre part, la sphinganine libre et la sphingosine libre ont été mesurées. Aucune modification n'est détectée, le ratio Sa/So est inchangé [16].

Des bovins à viande ont été nourris avec du maïs contenant FB1 et FB2 (530 mg/kg d'aliment). La majorité des fumonisines est retrouvée dans les fèces sous forme non métabolisée. Seules des traces sont retrouvées dans le plasma et les urines [17]. Les métabolites de FB1 représentent 60 à 90% des mycotoxines retrouvées dans les

fécès. Le métabolisme ruminal pourrait jouer un rôle dans la dégradation de la FB1 ce qui la rendrait moins biodisponible.

II.1.2.3. Volailles

Après gavage de poules pondeuses avec des doses de 2,0 mg/kg PV (= 47.6 kBq/kg PV) de fumonisine radio-marquée, l'absorption est faible. Le pic de concentration plasmatique correspondant à 28-103 ng FB1/ml se situe entre 1,5h et 2,5h [19].

II.1.3. Distribution

Après administration de ^{14}C -FB1 à des rats et des porcs par VO, de la radioactivité est retrouvée dans la plupart des tissus. Le foie et les reins contiennent les plus fortes concentrations [13, 20]. En général, le foie contient plus de radioactivité que les reins. Chez les poules et les vaches, la faible absorption de ^{14}C -FB1 est corrélée avec de faibles concentrations de radioactivité retrouvée dans les organes [14]. Aucun résidu n'a été trouvé dans les œufs des poules pondeuses [19]. Le lait ne contient ni FB1 ni ses métabolites [20, 21]. La barrière placentaire n'est pas franchie chez la rate gestante [22].

Dans les tissus, l'augmentation de Sa libre est parallèle à la distribution de la ^{14}C -FB1 [23]. Ce marqueur n'est toutefois pas validé chez homme.

II.1.3.1. Mammifères monogastriques

-le rat :

L'étude de la distribution de la FB1 chez le rat a commencé par des injections intra-péritonéales (IP) de 7,5 mg ^{14}C -FB1/kg PV. En 20 minutes on obtient la concentration maximale plasmatique de 8,6 $\mu\text{g/ml}$ (4% de la dose injectée). La décroissance suit une courbe mono exponentielle. Le temps de demi-vie est de 18 minutes [13]. On retrouve 1% de radioactivité dans le foie et moins de 1% dans les reins et les globules rouges. Avec la même dose, par voie orale, on ne retrouve que des traces non quantifiables dans le foie, les reins et les cellules de la lignée rouge [24]. Lors d'administration intra-gastrique de ^{14}C -FB1, on détecte encore la toxine

dans le foie et les reins 96 heures après [25]. Ceci suggère que la FB1 persiste dans les organes. Il peut exister un effet d'accumulation.

Alors que la FB1 est distribuée à la plupart des tissus, le foie et les reins retiennent la majorité de ce qui est absorbé. Par exemple, chez le mâle Wistar gavé avec de la FB1 pure, les reins contiennent 10 fois plus de FB1 que le foie [26].

Sur des rates gestantes, une heure après injection intra-veineuse de ^{14}C -FB1 seules de très faibles concentrations de fumonisine ont été retrouvées dans l'utérus, dans le placenta et les fœtus (0,015%). Ceci qui indique l'absence de transfert par le placenta. 14,5% de la dose sont retrouvées dans le foie et 4% dans les reins [22].

- le porc :

72 heures après l'injection IV de 0,4 mg ^{14}C -FB1 /kg PV, il reste 19,8% de la dose de radioactivité injectée. La radioactivité a été détectée et quantifiée dans le foie, les reins et la bile [20].

Lors de l'administration de doses décroissantes de ^{14}C -FB1 par VO à des porcs en croissance (protocole cf II.1.2.1), la radioactivité plasmatique augmente pendant la période de consommation d'aliment contaminé. Au 24^{ème} jour d'alimentation contaminée, le pic de radioactivité correspond à 160 ng/g dans le foie et 65 ng/g dans les reins. La rate, les muscles, l'encéphale, la graisse et les glandes endocrines de la peau ne présentent aucune trace de radioactivité, la limite de détection est de 11 ng/g de tissus. Le cœur et les poumons contiennent des traces de radioactivité non quantifiables, la limite de quantification est 20 ng/g de tissus. Après l'arrêt de l'exposition la radioactivité diminue de 35% dans les 3 jours. La limite de détection est atteinte après 9 jours sans alimentation contaminée [14].

- Le singe :

Après une injection intra-veineuse de 1,6mg ^{14}C -FB1/kg PV, l'élimination de la toxine suit une décroissance bi-exponentielle rapide (une phase de distribution de 30 minutes puis une phase d'élimination). Son temps de demi-vie est de 40 minutes [10]. Après administration orale d'un aliment contaminé radio-marqué, l'excrétion fécale est de 61% et l'excrétion urinaire de 1,2% de la dose ingérée dans les 3 jours suivant l'administration. Des traces résiduelles ont été trouvées dans les muscles squelettiques (1%), le foie (0,4%), le cerveau (0,2%), les reins, le cœur, le plasma, les hématies et la bile (0,1% chacun). La radioactivité dans l'intestin est de 12% de la dose administrée. Au total, 76% de la radioactivité sont retrouvés. L'analyse des

fèces et des urines prouve que 90% de la radioactivité retrouvée provient de la FB1 et de ses métabolites [10].

Une étude simultanée chez le singe compare le devenir de la toxine après injection IV (1,72 mg ¹⁴C-FB1/kg PV) et administration orale (6,42 mg ¹⁴C-FB1/kg PV). Les excréta sont récupérés pendant 24 heures, puis les singes sont sacrifiés. La majeure partie de la radioactivité se retrouve dans le foie (1,92% de la dose IV et 0,64% de la dose ingérée). Le reste se retrouve dans tous les organes : le muscle (0,62% et 0,14%), les reins (0,37% et 0,03%), le cerveau (0,8% et 0,02%), les poumons (0,07% et 0,03%), le cœur (0,04% et 0,01%), la rate (0,02% et <0,01%), le plasma (0,66% et 0,12%), les globules rouges (0,11% et 0,01%). Au total, 68,1% et 64% sont retrouvés dans la bile et le contenu intestinal [15].

II.1.3.2. Mammifères polygastriques

Deux vaches ont reçu respectivement 0,05 et 0,20 mg FB1/kg PV par IV. Un dosage des concentrations plasmatiques est fait pendant 12 heures. Ensuite, le suivi se fait tous les jours pendant 13 jours. La concentration plasmatique de FB1 suit une décroissance bi-exponentielle. 120 minutes après l'injection, la concentration de la toxine est sous le seuil de détection. Aucun métabolite n'est retrouvé dans le plasma. Aucun changement significatif dans le ratio Sa/So n'est obtenu avec une dose de 0,05 mg FB1/kg PV. A la dose de 0,20 mg FB1/kg PV, le ratio change légèrement, la Sa plasmatique augmente de façon transitoire alors que la So reste stable. Suite à l'administration par VO de 1,0 et 5,0 mg FB1/kg PV, aucune trace de FB1 ni de ses métabolites n'est retrouvée dans le plasma. Quelle que soit la dose administrée par voie orale, aucune modification des concentrations des sphingolipides n'est détectée [16].

La métabolisation de la FB1 par la flore ruminale a été étudiée. Elle était supposée jouer un rôle dans la dégradation de la FB1 ce qui la rendrait moins biodisponible et aurait expliqué la résistance des ruminants. L'incubation de 1µg FB1/ml de jus ruminal pendant 72 heures met en évidence une très faible métabolisation. En effet, une baisse de 12% de la dose de FB1 est mesurée, aucun produit d'hydrolyse n'est retrouvé. Par ailleurs, la FB1 n'a aucun effet sur la formation d'acides gras à courte chaîne par la flore ruminale. L'origine de la résistance des ruminants aux fumonisines n'est pas encore déterminée [18].

II.1.3.3. Volailles

Lors de l'injection IV de ^{14}C -FB1 (2,0 mg/kg PV = 23,68 kBq/kg PV) à des poules pondeuses, la décroissance de radioactivité plasmatique est bi-exponentielle. Après 4 à 6 heures, les valeurs sont négligeables. La clairance plasmatique est 1,18 ml/min [19]. L'administration par VO d'une dose de ^{14}C -FB1 (2,0 mg/kg PV = 47,36 kBq/kg PV) montre une absorption faible (C_{max} = 28-103 ng FB1/ml pour un T_{max} entre 1,5 et 2,5 heures). 24 heures après l'administration, il ne reste que quelques traces dans le jabot, le foie, les reins, l'intestin grêle et le caecum [19].

II.1.4. Métabolisme

Actuellement, on ne sait toujours pas où a lieu la métabolisation de la FB1 si elle a lieu.

La FB1 possède deux types de métabolites. La FB1 partiellement hydrolysée (pHFB1) possède un groupe acide carboxylique en moins. La FB1 hydrolysée (HFB1) a perdu deux acides carboxyliques. La HFB1 est moins polaire que la FB1. Cette propriété lui permet de mieux traverser les membranes cellulaires.

La HFB1 est retrouvée dans des aliments à base de maïs ayant subi un processus de nixtamalisation. Ce traitement utilise de l'hydroxyde de calcium puis un chauffage des aliments.

Les effets des métabolites sont moins étudiés que ceux de la FB1. Cependant, une étude a été menée pour déterminer la toxicité de ces molécules. Trois lots de rats ont été alimentés avec de la FB1, de la HFB1 et de la pHFB1. Des lésions « FB-like » sont retrouvées sur le foie et les reins [22].

La HFB1 n'initie pas le cancer mais est plus cytotoxique que la FB1 [1].

Chez les rats, une grande partie de la ^{14}C -FB1 administrée per os est retrouvée intacte dans les fèces [13]. Par ailleurs, l'excrétion biliaire de FB1 et HFB1 est la même. Ceci laisse supposer que la HFB1 est réabsorbée par le tractus digestif [27].

Sur une culture de cellules primaires d'hépatocytes, la ^{14}C -FB1 est autant liée au compartiment hydrophile que lipophile. Après 44 heures d'incubation, aucun métabolite n'est détecté. Une étude sur microsomes hépatiques a été menée. Aucune métabolisation n'est observée. Par ailleurs, l'activité du cytochrome P450 est altérée par la FB1. Cette inhibition est due aux effets délétères de la FB1 sur le métabolisme des sphingolipides. En effet, l'inhibition du cytochrome P450 2C11 a été reliée à la suppression de l'activité de la protéine kinase C [28].

Sur des cellules LLC-PK1, un équilibre de concentration de ^{14}C -FB1 s'installe entre les secteurs intra et extra-cellulaire après 4 à 16 heures d'incubation [29].

Des résultats différents sont obtenus chez le singe vervet. Des singes ont reçu de la ^{14}C -FB1 par IV ou VO. 68,1% et 64,0% sont retrouvés dans les excréta. L'analyse des fécès et du contenu intestinal montre que la radioactivité est due à FB1, pHFB1 et HFB1. Aucune trace de métabolite n'est retrouvée dans la bile ou les urines. Ceci laisse supposer que la métabolisation de la FB1 a lieu dans l'intestin chez le singe. La question se pose d'une métabolisation microbienne [15].

II.1.5. Elimination :

Lorsque la ^{14}C -FB1 est administrée à des rats ou à des singes, l'élimination est rapide. Après injection IV de ^{14}C -FB1, la distribution est large et l'élimination rapide chez le singe vervet et le rat [13]. Le devenir des fumonisines suit chez ces deux espèces un modèle mono ou bi-exponentiel. Chez le porc, l'élimination de la ^{14}C -FB1 suit un modèle tri-exponentiel. Les études menées dans cette espèce y confirment l'existence d'un cycle entéro-hépatique.

La majeure partie de la fumonisine est éliminée sous forme non métabolisée dans les selles. Les primates non humains sont une exception.

Les vaches éliminent rapidement les fumonisines. Le lait contient très peu de fumonisines.

Des études *in vitro* sur des cellules primaires d'hépatocytes et LLC-PK1 ont montré qu'une faible quantité de ^{14}C -FB1 persiste dans le cytoplasme longtemps après la diffusion rapide de ^{14}C -FB1 [31, 32]. Ce pool retenu maintient la concentration des bases sphingoïdes libres élevés dans les cellules et les urines.

II.1.5.1. Mammifères monogastriques

- Le rat :

Après injection de ^{14}C -FB1 par voie IP, on retrouve 66% de la dose dans les fécès et 32% dans les urines. Suite à l'administration par voie orale, 100% de la radioactivité se retrouvent dans les fécès. Il n'y a que quelques traces dans les urines [13]. Dans une autre études, après administration intra-gastrique, plus de 80% de la radioactivité sont retrouvés dans les fécès et plus de 3% dans les urines. Le reste de la radioactivité persiste quelques temps dans les tissus (foie, rein) et les

globules rouges. L'administration de ^{14}C -FB1 à des rats par voie orale pendant 3 jours n'entraîne pas de phénomène d'accumulation dans le foie et les reins [25].

Ces observations sont complétées par celles faites sur des rats auxquels on a injecté par IV de la ^{14}C -FB1. Plus de 35% de la dose sont retrouvés dans les fécès. Ceci indique qu'une élimination par voie biliaire existe [25]. L'excrétion biliaire de la FB1 a été évaluée. Après une injection IP de 7,5 mg FB1/kg PV, 67% de la dose (dont 88% dans les 4 premières heures) se retrouvent dans la bile 24 heures après l'injection. L'excrétion biliaire de la FB1 lors d'une administration par voie orale représente 0,2% de la dose après 24 heures [10].

- Le porc :

72 heures après une injection IV de ^{14}C -FB1, 21,2% de la radioactivité sont retrouvés dans les urines et 58% dans les fèces. Suite à une administration par voie orale, près de 90% de la ^{14}C -FB1 sont retrouvés dans les fèces et moins d'1% dans les urines [20].

Suite à l'injection IV, l'élimination plasmatique suit un modèle tri-exponentiel ($T_{1/2\alpha} = 2,5$ min, $T_{1/2\beta} = 10,5$ min, $T_{1/2\gamma} = 183$ min). Ce n'est pas en corrélation avec les résultats obtenus dans les autres espèces. Pour expliquer cela, une cathétérisation du canal cholédoque est réalisée sur des porcs et une injection IV de ^{14}C -FB1 a été effectuée. Il résulte que 70,8% de la dose se retrouve dans la bile. Ceci suggère l'existence d'un cycle entéro-hépatique [20].

Après exposition de porcs à des doses de 2-3 mg FB1/kg d'aliment, une période d'au moins 2 semaines est observée avant qu'aucune trace de la ^{14}C -FB1 ne soit décelable dans le foie et les reins. Cependant, le $T_{1/2}$ plasmatique mesuré chez des porcs contaminés per os est de 96 minutes [14]. Le lait des truies contaminées ne contient aucune trace.

NB : $T_{1/2\alpha}$ correspond à la distribution, $T_{1/2\beta}$ à l'élimination, $T_{1/2\gamma}$ à l'excrétion.

- Le singe:

47% de la dose de ^{14}C -FB1 administrée (1,72 mg/kg PV) par voie IV sont retrouvés dans les urines et les fécès 5 jours suivant l'injection. La radioactivité est issue à 90% de FB1 et de ses produits d'hydrolyse [15].

Lors d'une administration par voie orale (6,42 mg/kg PV), 61% de la dose sont retrouvés dans les fécès et 1,2% dans les urines 3 jours suivant l'ingestion. Aucun produit de métabolisation n'est retrouvé dans les urines [33].

II.1.5.2. Mammifères polygastriques

Suite à l'injection IV de doses de 0,05 à 0,2 mg FB1 /kg PV à des vaches, la toxine est rapidement éliminée. Dans cette espèce, l'élimination plasmatique suit un modèle bi exponentiel ($T_{1/2\alpha} < 2$ minutes et $T_{1/2\beta} = 15-18$ min). Après 120 minutes aucune trace de toxine n'est détectée dans le plasma [16].

L'élimination par voie lactée a été testée. Aucune trace de FB1 ou de ses métabolites ne sont retrouvées dans le lait de vaches auxquelles ont été administrés per os 1 et 5 mg FB1/kg PV ou 0,05 et 0,20 mg FB1/kg PV par IV [34]. De même, 2 mg de fumonisines ont été injectés à 3 vaches en lactation. Les concentrations de fumonisines sont mesurées dans le plasma et le lait pendant 150 minutes. La fumonisine passe dans le lait mais en si faible quantité qu'elle ne représente aucun risque pour le consommateur [35].

II.1.5.3. Volailles

Chez la poule pondeuse, 24 heures après l'administration par VO ou l'injection IV de ^{14}C -FB1, la quasi totalité de la radioactivité ($97,7 \pm 3,73\%$) se retrouve dans les excréta. Aucun résidu n'est détecté dans les œufs pondus au-delà des 24 heures [19].

II.2. Méthodes analytiques des fumonisines

Les premiers dosages ont été réalisés dans des denrées alimentaires brutes ou transformées comme les céréales et leurs dérivés. Les techniques utilisées sur matrice végétale ont été adaptées pour des dosages dans des matrices carnées et sont encore en cours d'évolution. Elles reposent sur les propriétés physiques et chimiques des fumonisines. Les étapes analytiques sont l'échantillonnage, l'extraction de la fumonisine, la purification, la détection et la quantification. Les différentes techniques techniques et leurs limites de détection (LD) sont répertoriées dans le tableau I. Les techniques sont classées selon leurs performances. Au sein de chaque technique, la matrice, les méthodes de purification et de dérivation donnent lieu à un nouveau classement.

Tableau I : Techniques de détection des fumonisines

Méthode	Matrice	Purification	Marquage	Limites	Références
CCM	Maïs	?	Fluorescamine	LD= 0,1 µg/g	[39]
		SAX	Vaniline	LD= 0,250 µg/g	[50]
		?	P-anysaldéhyde	LD= 100 µg/g	[49]
		?	P-anysaldéhyde	LD= 500 µg/g	[48]
CCM-LSD	Maïs	échange d'ions	P-anysaldéhyde	LD= 0,5 µg/g	[81]
CG/ FAB-MS	Maïs	SAX	Deuterium	LD= 0,01 µg/g	[53]
CG/ MS	Maïs	?	?	LD= 0,5 µg/g	[48]
HPLC/ Fluorométrie	Maïs	SAX	OPA	LD 0,01 à 0,05 µg/g	[66]
	Aliments		FMOC	LD= 0,1 µg/g	[62]
	Maïs		NBDF	LD= 0,1 µg/g	[62]
	Banane		NBDF	LD= 0,13 µg/g	[84]
	Maïs	C ₁₈	AccQ Fluor	LD= 0,26 µg/g	[64]
	Aliments		Fluorescamine	LD= 1µg/g	[57]
	Lait	SAX	Naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde + KCN	LD= 0,005 µg/ml	[61]
	Urines et plasma		OPA	LD= 0,05 µg/ml	[24]
	Urines		OPA	LD= 0,008 µg/ml	[83]
	Fécès	C ₁₈	OPA	LD= 0,4 µg/g matière fécale sèche	[10]
	Lait	Immunoaffinité	?	LD= 0,003 µg/ml	[34]
	Aliments		OPA	LD= 0,003µg/g	[85]
	Maïs		OPA et 2βME	LD= 0,05 µg/g	[43]
	Maïs		Naphtalène- 2,3-dicarboxaldéhyde	LD= 0,05 µg/g LD= 0,1-0,05 µg/g	[86]
	Maïs		OPA	LD= 0,05-1,05µg/g	[87]
Maïs	OPA et 2βME		LD= 0,25 µg/g	[67]	
HPLC ES-MS quadrupole	Maïs		Deutérium	LQ= 0,00008 µg/g	[69]
HPLC / TS-MS	?	?		LD= 0,002 µg/g	[73]
HPLC FAB-MS-MS	Maïs	SAX		LD= 0,005 µg/g	[68]
HPLC ELSD	Standards			LD= 0,006 µg/ml	[75]
HPLC APCI-MS-MS	Maïs	SAX Mycosep®		LD= 0,02 µg/g LQ= 0,05 µg/g	[74]
HPLC ES-MS	Maïs			LD= 0,1-0,02 µg/g	[71]
HPLC FAB-MS	Maïs	SAX	Deuterium	LD= 0,1 µg/g	[53]
EC	Maïs	Immunoaffinité	Fluorescéine	LD= 0,05 µg/g	[78]
EC ES- MS	Maïs	?		LD=0,156 µg/g	[77]
EC	Aliments	C ₁₈	FMOC	LD= 0,5 µg/g	[76]
ELISA	Bière			LD= 0,003 µg/ml	[88]
	Lait			LD= 0,25 µg/ml	[61]
	Aliments ou tissus			LD= 0,05 µg/ml	[45]
				LD= 0,1 µg/ml	[46]

Légende du tableau :

AccQ.Fluor : 6-aminoquinoyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate

APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique

CCM : Chromatographie sur couche mince

C18: Colonne greffée C18

EC: Electrophorèse capillaire

ELEM: Leuco encéphalomalacie equine

ELISA: Enzyme linked immuno assay

ELSD: Evaporative light scattering detection

ES: Electrospray

FAB : Bombardement rapide d'atomes

FMOC : 9-fluorenylméthyl-chloroformate

HPLC: Chromatographie liquide haute performance

LD : Limite de détection

LQ : Limite de quantification

LSD : laser scanning densitometry

MS : Spectrometrie de masse

NBDF: 4-fluoro-7-Nitrobenzofurazan

OPA: O-phthaldialdéhyde

PPE : Oedème pulmonaire porcin

SAX : Colonne à échange d'ions

TS: Thermospray

2βME: 2β-mercaptoethanol

II.2.1. Echantillonnage, homogénéisation

Les plus fortes concentrations de FB1 sont généralement observées dans les grains altérés. La contamination des grains par les moisissures n'est pas homogène et la contamination par les FB non systématique. Les échantillons d'1kg sont prévus par les plans d'échantillonnage. Dans l'aliment à analyser, les prélèvements sont effectués de manière aléatoire. Certains échantillons peuvent être issus d'aliments donnés à des animaux présentant des signes d'ELEM ou de PPE. D'autres échantillons consistent en des lots d'aliments à base de maïs à destination de l'humain. Un matériel homogène est obtenu en broyant les échantillons à une taille inférieure à 2 mm.

II.2.2. Extraction

L'extraction est la première étape pour la récupération des fumonisines dans les matrices. Les fumonisines sont hydrosolubles, elles possèdent quatre acides carboxyliques (Figure 1). Différents solvants d'hydrophilie variable ont été testés. Des mélanges d'ACN-H₂O (1 /1) ou de méthanol-eau (3 /1) sont le plus fréquemment utilisés [1]. La norme AFNOR NF EN 13585 détermine comment traiter les échantillons à ce niveau. Une prise d'essais de 50 g est prélevée et additionnée à 100 ml de MeOH-H₂O (1/1). Le mélange est broyé et agité 3 minutes. Le pourcentage d'extraction de FB1 est de 89 à 96 %. L'homogénat est ensuite centrifugé, le surnageant filtré et le pH ajusté à 5,8 avec de l'acide chlorhydrique en vue de la purification. Sur des matrices liquides, le broyage et d'homogénéisation ne sont pas nécessaires. Il existe une grande variabilité d'efficacité selon les techniques d'extraction.

II.2.3. Purification

L'étape de purification a pour but d'obtenir un extrait contenant un minimum de molécules « parasites » provenant de la matrice. Un passage sur phase solide est parfois réalisé. 3 techniques différentes existent.

II.2.3.1. Colonne échangeuse d'ions (SAX)

La phase solide la plus souvent utilisée est la colonne échangeuse d'ions (SAX). Une chaîne aliphatique d'ammonium quaternaire est liée à la silice. Le principe de fonctionnement repose sur une compétition ionique. L'attraction électrostatique permet la rétention sur la colonne d'ions chargés négativement. Les composés à analyser doivent donc être présent sous forme anionique dans le solvant. Les fumonisines étant des poly-acides, un pH inférieur à 5,8 ne permet pas leur ionisation. Le pH idéal pour l'ionisation des fumonisines se situe entre 5,8 et 6,5 [36]. Le conditionnement de la colonne se fait par passage successif de méthanol puis d'un mélange MeOH-H₂O (3/1). La solution à purifier est passée ensuite sur la colonne. La récupération des fumonisines nécessite une élution avec une solution de méthanol acide. Il a été estimé que la vitesse de progression du soluté dans la colonne n'est pas un facteur modifiant la récupération [36]. Cependant, pour optimiser la collecte, la vitesse de passage recommandée pour l'éluant sur la colonne est de 1ml/min [37]. De meilleurs résultats sont obtenus par passage d'une solution d'acide acétique à 1% dans MeOH [38].

II.2.3.2. Colonne greffée C₁₈

Les colonnes de silice greffées C₈ et C₁₈ sont également utilisables. Elles résistent bien à la pression et donnent des résultats reproductibles. Un des avantages majeurs de cette technique est la faible utilisation de solvants. La colonne est conditionnée avec du méthanol puis du chlorure de potassium (KCl) aqueux à 1%. L'extrait à purifier est passé sur la colonne et séparé sur la phase stationnaire. Un lavage avec une solution ACN-KCl 1% (1/9) a lieu. Finalement, l'élution est faite avec une solution d'ACN-H₂O (7/3) [39].

Comparaison C₁₈/SAX

Pour des concentrations en fumonisines inférieures à 1µg/g, le système de colonne SAX est recommandé. La séparation des fumonisines est moins bonne sur colonne C₁₈ car elles peuvent précipiter [40]. Les variations de mesures obtenues avec les cartouches C₁₈ sont supposées être imputables à des interactions entre les fumonisines et les sites actifs [41]. L'utilisation de colonne

C₁₈ pour le nettoyage de l'échantillon ne permet pas d'améliorer nettement les quantités détectées. Cette technique utilise les mêmes propriétés de séparation que la colonne du système HPLC utilisée pour le dosage. La purification sélectionne donc les mêmes molécules que la colonne de séparation ce qui rend ce système moins sélectif que la SAX.

La SAX n'est pas utilisable pour déterminer les quantités d'aminopolyols hydrolysés car il leur manque les groupements acides carboxyliques anioniques et ils ne se fixent pas à la colonne.

II.2.3.3. Colonne à immunoaffinité

L'utilisation de colonnes à immunoaffinité se base sur la formation d'un complexe antigène-anticorps [42, 43]. Elles présentent une bonne sélectivité. Ces techniques permettent de récupérer plus de 70% de la fumonisine. Les anticorps utilisés sont liés à un support d'agarose, de sépharose ou de dextran. La colonne est conditionnée, l'échantillon est passé. La formation de complexe antigène-anticorps fixe les fumonisines. Le rinçage élimine les composants indésirables de la matrice. L'élution utilisant un solvant qui dénature les anticorps permet de récupérer les fumonisines : il est possible d'altérer le complexe anticorps antigène en utilisant du méthanol [42].

II.2.3.4. Purification des échantillons d'origine animale.

La purification des échantillons d'origine animale (plasma, urines, selles, bile, foie, muscle, reins, lait) utilise les mêmes méthodes que lorsqu'il s'agit de matrices végétales. On utilise une colonne à SAX pour purifier les urines et le plasma avec de légères modifications par rapport aux méthodes décrites précédemment [13, 15, 44]. Les protéines plasmatiques sont précipitées par adjonction de MeOH. Une centrifugation permet la récupération du surnageant qui est alors passé sur la colonne SAX. Les urines sont diluées avant passage sur la colonne. Les extraits fécaux sont passés sur colonne C₁₈ permettant l'isolation des FB1 ainsi que leurs métabolites pHFB1 et HFB1 [10].

II.2.4. Dérivatisation

Les fumonisines ne possèdent pas de groupements chromophores donc aucune propriété d'absorption dans l'ultra violet (UV) ou de fluorescence. Il est donc nécessaire de les rendre détectables par les systèmes utilisant des méthodes fluorométriques ou UV. Pour cela, on greffe un agent chromophore (ou un fluorophore) sur une portion de la molécule. On parle de dérivatisation. Cette étape peut avoir lieu avant ou après le passage dans le système de séparation. Le choix d'un bon agent de dérivatisation implique que :

- la dérivatisation soit rapide et quantitative
 - les sous produits et les réactifs en excès ne doivent pas interférer avec la formation de la fluorescence
 - le fluorophore doit avoir des limites d'absorption fortes
 - le réactif doit être stable
 - l'analyte doit réagir avec l'agent de dérivatisation (pour la FB1 il s'agit soit de l'amine soit d'un groupement acide)
 - l'agent de dérivatisation et les sous produits ne doivent pas être fluorescents.
- Les agents de dérivatisation seront étudiés pour chaque technique les utilisant.

II.2.5. Détection, quantification.

La chromatographie liquide haute pression (HPLC) est la méthode de séparation de référence développée par Shephard et coll en 1990 et améliorée par Sydenham et coll en 1992. Elle peut utiliser des techniques de détection par spectrométrie de masse, fluorométrie ou radiodétection. La chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase gazeuse (CG) sont également utilisables. Récemment, des techniques ELISA ont été mises au point [45, 46, 47]. Ces techniques permettent de détecter et quantifier les fumonisines avec des limites de détection très variables en fonction des solutions utilisées et des matrices explorées.

II.2.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La technique la plus ancienne est la CCM, elle est rapide et peut être automatisée ce qui est un avantage non négligeable. La technique est utilisable sans phase de purification.

Sans purification, la limite de détection est de 100 µg/g et avec purification 5 µg/g. La première méthode développée utilisait deux types de plaques. La première est une plaque de silice de phase C₁₈ ou C₈ avec un solvant MeOH-H₂O (3/1). L'autre est une plaque de silice normale avec un solvant chloroforme-MeOH-H₂O-EtOH [48].

La dérivation a lieu en fin de séparation des molécules. La vaporisation de p-anisaldéhyde ou de ninhydrine permet la visualisation des molécules de fumonisines. La meilleure technique consisterait en l'utilisation de ninhydrine pour détecter les fumonisines dans les extraits purifiés. Le p-anisaldéhyde serait plus avantageux dans les extraits non purifiés contenant plus de 150 µg/g de FB1 [49]. Les limites de détection n'étant pas suffisantes pour détecter des fumonisines dans du maïs naturellement contaminé, de nouvelles techniques ont été mises au point. Pour obtenir une limite de détection de 100 µg/g, il est possible de développer en deux étapes. La section la plus basse de la plaque de silice est retirée entre les 2 étapes et les fumonisines sont quantifiées par spectrophotodensitométrie après application d'un spray de p-anisaldéhyde [49]. L'utilisation de fluorescamine pour la révélation sous UV augmente la sensibilité et la sélectivité rendant la CCM utilisable pour le dosage des maïs naturellement contaminés [39]. La LD est alors de 0,1 µg/g. Des interférences dues à la matrice peuvent toutefois augmenter la LD à 1 µg/g. Mais le nettoyage des échantillons sur une colonne SAX avant la CCM permet d'obtenir une LD de 0,250 µg/g avec une plaque phase inverse. La visualisation des fumonisines fait suite à la vaporisation d'une solution composée de 0,5% de vaniline dans 97% d'acide sulfurique-EtOH (4/1). Un spot bleu-pourpre correspondant à la FB1 apparaît après chauffage 10 minutes à 120°C [50].

II.2.5.2. Chromatographie gazeuse (CG)

Le gaz utilisé est l'hélium. Cette technique s'utilise en association avec des détecteurs faisant appel à des techniques telles la spectrométrie de masse (MS)

[50, 51] et l'ionisation de flamme (FID) [48]. Deux techniques essentielles émergent :

-la première consiste en une hydrolyse acide des fumonisines, entraînant un clivage des liaisons esters. L'acide tricarboxylique estérifié avec l'isobutanol est détecté par spectrométrie de masse. Avec la spectrométrie de masse, on obtient une LD de 1 µg/g [48].

-une autre technique utilise une hydrolyse alcaline : la fumonisine contenue dans l'échantillon est hydrolysée par action de KOH à 60°C pendant 1 heure. L'acide 1,2,3-propane-tricarboxylique est libéré et méthylé. L'ester ainsi formé est volatile et détecté par ionisation de flamme. La LD est de 0,5 µg/g.

La quantification peut être biaisée car la moisissure peut synthétiser d'autres composés qui permettent de produire le même acide [48].

Notons que le dosage par SM peut être amélioré par marquage des groupements méthyle de la fumonisine au deutérium. Ainsi, on obtient une LD de 0,01 µg/g [53].

II.2.5.3. Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

La chromatographie liquide haute pression est très utilisée. 90% des laboratoires l'utilisent comme technique de référence. Une colonne à phase inverse, C₈ ou C₁₈ est utilisée pour la séparation [54, 55]. La fluorométrie est la méthode la plus utilisée pour la détection. La spectrométrie de masse et la radiodétection sont également utilisables.

II.2.5.3.1. HPLC/ Fluorométrie

Pour la détection en fluorométrie, la dérivation est indispensable. Elle a lieu dans la majorité des cas avant le passage dans la colonne HPLC. Tous les agents de dérivation ne sont pas adaptés à la recherche des fumonisines. Ces agents sont choisis en fonction de leurs propriétés et des différentes matrices. Une étude comparative montre que le 9-fluorenylméthyl-chloroformate (FMOC) et la fluorescamine ne sont pas de bons agents de dérivation pour la recherche des fumonisines dans le maïs, alors que le 4-fluoro-7-Nitrobenzofurazan (NBD) et le 4-(N,N-diméthylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD) sont recommandés [56].

- Les premières techniques utilisant l'anhydride maléique permettaient d'obtenir une LD de 10 µg/g. Le pic obtenu était mal individualisé du fait d'autres composés présents dans le maïs. La LD est obtenue à partir de maïs contaminé artificiellement, la technique n'est pas recommandable pour la détection de contaminations naturelles [48].
- L'utilisation de la fluorescamine présente une sensibilité intéressante [57, 58]. Cependant, sur le chromatogramme, la FB1 donne deux pics correspondant à une lactone et un produit d'hydrolyse formés lors de la réaction avec la fluorescamine. Ces deux pics rendent l'interprétation des chromatogrammes difficile, donc la fluorescamine est peu recommandée pour la dérivation des fumonisines [48, 58].
- L'O-phthalaldéhyde (OPA) est le réactif de choix pour la dérivation, il a une très bonne sensibilité et est utilisé par la plupart des laboratoires [59]. L'adjonction de 2β-mercaptoéthanol à l'OPA permet une réaction rapide et reproductible sur un échantillon contenu dans un tampon borate à pH 9-10 à température ambiante. Cet agent présente cependant des limites. La réaction de fluorescence n'est pas stable au-delà de 4 minutes après la préparation. Une diminution de 5% de fluorescence a lieu à 8 minutes et cela empire au-delà. Une standardisation du temps de réaction a été mise au point pour limiter cet inconvénient. L'injection dans la colonne HPLC est faite 2 minutes après mise en solution. Ainsi, une LD de 0,05 µg/g est obtenue. Les solutions d'OPA sont conservées 10 jours maximum à l'abri de la lumière car elles y sont instables [43].
- Le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde additionné à du KCN donne une très bonne fluorescence. Il permet une détection de 50 pg de FB1 standard [41, 60]. La technique a été utilisée dans le dosage de FB1 dans le lait avec une LD de 0,005 µg/ml [61]. La stabilité des produits dérivés est supérieure à 24 heures.
- Le 4-fluoro-7-Nitrobenzofurazan (NBDF) permet d'obtenir une LD de 0,1 µg/g. [62]. Il présente des limites de stabilité.
- Le 9-fluorenylméthyl-chloroformate (FMOC) donne une LD de 0,2 µg/g [63]. L'utilisation de cet agent est bonne dans la recherche de fumonisines dans les aliments. Les solutions dérivées sont stables 72 heures.
- Le 6-aminoquinoyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate permet de détecter la FB1 avec une LD 0,26 µg/g. Les dérivés sont stables pendant 4 heures [64].

- Le 1-diméthylaminonaphtalène-5-sulphonyl-chloride est un agent inutilisable sur le maïs en raison d'interférences analytiques [62].

Etudes comparatives entre laboratoires de la technique HPLC/fluorométrie.

La dérivation avec OPA, après passage sur colonne SAX après élution avec une solution de MeOH-H₂O (3/4) a été validée par 11 laboratoires de 6 pays dans du maïs naturellement contaminé. Les valeurs trouvées s'échelonnent entre 2 µg/g et 0,2 µg/g avec une répétabilité intra laboratoire de 7,7 à 25,5% et une répétabilité inter laboratoires de 18 à 26,6%.

D'autre part, une comparaison européenne a été menée utilisant la même technique de dosage. Des échantillons de maïs non contaminés et contaminés à 2 µg/g ont été testés. Sur 24 laboratoires, la variation intra laboratoire de la répétabilité est de 10% et la variation inter laboratoires de la répétabilité est de 11% [65].

L'extraction avec un mélange ACN-H₂O, puis passage sur colonne SAX, dérivation avec OPA et détection par HPLC phase inverse est donc une méthode validée d'analyse des fumonisines dans le maïs. La LD est de 0,05 à 0,01 µg/g [66].

Les fumonisines contenues dans les urines et le plasma sont recherchées en utilisant une technique HPLC phase inverse. Les fumonisines sont d'abord extraites par passage sur colonne SAX. La dérivation utilise l'OPA. La sensibilité obtenue est intéressante avec une limite de détection de 0,05 µg/ml. La technique est reproductible (variation < 5%) et précise (>85%) [44].

II.2.5.3.2. HPLC/ Spectrométrie de masse (SM)

L'association de la spectrométrie de masse à l'HPLC permet de s'affranchir de la dérivation. Cette association permet une forte confirmation de la présence de fumonisines dans les échantillons.

La première utilisation de la SM s'est faite en association avec la chromatographie gazeuse. Elle permettait la séparation des formes hydrolysées. La spectrométrie de masse nécessite l'ionisation des molécules. Trois procédés sont utilisés :

- Bombardement rapide d'atomes (fast atom bombardment FAB), FAB-SM

La détermination de FB1 dans du maïs naturellement contaminé nécessite un marquage au deutérium puis un lavage sur colonne SAX. Le passage par FAB-SM permet d'obtenir une LD de 0,1 µg/g [53, 68].

En associant un système FAB-SM à un autre SM, il est possible d'obtenir une LD de 0,005 µg/g [68].

Plus récemment une association de deux spectromètres de masse plus performants a été testée. La limite de quantification (LQ) obtenue est de 0,00008 µg/g [69].

- Electrospray (ES), ES- SM.

L'électrospray consiste en une ionisation à pression atmosphérique. C'est une des premières méthodes pour l'analyse des FB1. Elle utilise une colonne HPLC phase inverse et un solvant ACN-H₂O-EtOH [70]. L'éluat est soumis à un ES-SM ce qui donne un signal fort pour les molécules et les sels alcalins. La LD est de 0,1 µg/g [71]. La méthode utilise une colonne polymérique hydrophobe. La phase mobile se compose d'ACN volatile et d'un acétate d'ammonium aqueux. Les ions sélectionnés sont positifs. Il est possible d'optimiser cette technique en utilisant une colonne à immunoaffinité pour augmenter la purification des extraits. Cette technique est utilisée dans la recherche de FB1 dans les aliments avec une LQ de 0,001 µg/g [72].

- Thermospray (TS), TS- SM.

L'association TS-SM permet d'atteindre une LD de 0,002 µg/g sur des échantillons de maïs. Cette LD est obtenue en utilisant un mode à ions négatifs et une phase mobile ACN-Acétate d'ammonium aqueux [73].

- Ionisation chimique à pression atmosphérique.

Cette méthode utilise deux phases solides de purification (SAX et Mycosep®) avant l'HPLC. La détection est faite avec l'association de deux spectromètres de masse (APCI- SM/SM). La LD obtenue est 0,02 µg/g et la LQ= 0,05 µg/g dans le maïs [74].

II.2.5.3.3. HPLC/ Evaporative light scattering detection (ELSD)

L'association de l'HPLC à un détecteur «evaporative light-scattering detection » permet également de ne pas dériver les échantillons [75]. On obtient une bonne séparation des fumonisines, un faible bruit de fond, des formes de pics satisfaisantes et une bonne sensibilité. La technique permet de doser 60 ng de FB1 par injection. Le débit d'élution est important et influence la limite de détection. Cette dernière est de l'ordre de 0,006 µg/ml [75].

II.2.5.4. L'électrophorèse capillaire (EC)

La technique donne des résultats comparables à ceux obtenus après purification sur colonne C₁₈ ou SAX et dosage HPLC. L'électrophorèse capillaire permet de quantifier les FB1 dans le maïs en utilisant un minimum de solvants organiques. La technique utilise une colonne à diamètre inférieur à celui de la colonne HPLC. Les pics obtenus sont plus étroits et plus fins.

Si la FB1 est mise en évidence par dérivatisation au FMOC, la LD est de 0,5 µg/g [76].

Si les fumonisines sont révélées par ES- SM, la LD est de 0,156 µg/g [77].

Une dernière variante consiste en la purification des fumonisines contenues dans le maïs sur colonne à immunoaffinité avant dérivatisation avec la fluorescéine. La limite de détection est de 0,050 µg/g dans le maïs [78].

II.2.5.5. Techniques ELISA

Les techniques ELISA sont très utilisées dans la recherche des fumonisines dans le maïs, de nombreux laboratoires les commercialisent. Leur rapidité d'utilisation en fait un bon outil pour le « screening » du maïs. Les techniques mises au point par l'équipe d'Azcona-Oliveira utilisent des puits comportant des anticorps mono- et polyclonaux vis-à-vis des fumonisines B1, B2 et B3. La comparaison de l'ELISA monoclonale et polyclonale montre que les concentrations obtenues sont supérieures en utilisant l'ELISA monoclonale [79]. Les ELISA polyclonales ne sont utilisées qu'en première détection sur le maïs. Les limites de détection sont 0,1 à 0,05 µg/ml. Les valeurs mesurées sur des

échantillons de maïs naturellement contaminés sont meilleures que celles obtenues avec la technique HPLC. Cependant, des réactions croisées peuvent exister entre la FB1, la FB2 et la FB3 mais pas avec les molécules dérivées de l'hydrolyse (pHFB1, HFB1 et acides tricarboxyliques) [45, 46]. L'efficacité de la technique dépend beaucoup de l'anticorps utilisé [7].

II.2.5.6. Autres méthodes associées étudiées.

- Une détection électrochimique n'est pas aussi sensible et stable que la détection fluorométrique [80].
- Une méthode couple une séparation par chromatographie à échange d'ions à une détection CCM-densitométrie laser. La limite de détection pour les fumonisines est 0,5 µg/g [81].

II.2.6. Adaptation aux matrices carnées.

Les principales méthodes décrites dans les matrices végétales s'appliquent aux matrices carnées. La seule différence se trouve lors de l'extraction et la purification. Les auteurs décrivent les modalités expérimentales concernant chaque type de matrice.

- Le sang

Les prélèvements de sang sont faits sur tubes EDTA. Les plasmas sont aliquotés en échantillons de 500 µl puis dilués dans 1 ml d'eau. Ils sont déprotéinisés par ajout de 1,5 ml d'ACN. Une centrifugation de 10 minutes à 1200 g à 10°C permet d'obtenir un surnageant dont 2 ml sont prélevés. Une cartouche SAX conditionnée avec 5 ml d'ACN et 5 ml d'ACN-H₂O (1/1) est utilisée. La colonne est nettoyée avec 5 ml ACN-H₂O (1/1) puis 5 ml de MeOH. L'élution est faite avec 10 ml d'une solution d'acide acétique à 5% dans le MeOH. La vitesse du flux à travers la cartouche est maintenue à 1-1,5 ml/min. L'éluat est séché sous un courant d'azote à 60°C. Les résidus secs sont dissous dans 200 µl de tampon borate à 0,1 M [10, 15].

- Les urines

Les échantillons de 250 µl d'urines sont dilués avec 750µl d'eau et 3 ml de MeOH. Une colonne SAX pré-conditionnée avec 5 ml de MeOH puis 5 ml de MeOH-H₂O (3 /1) est utilisée. La colonne est nettoyée avec les mêmes solutions dans l'ordre inverse. Les éluats sont ensuite traités comme ceux du plasma. Les extraits secs sont dissous dans le MeOH avant passage sur HPLC [10, 15].

- Les fécès

Les échantillons de fécès sont congelés à sec après collecte et réduits en poudre. Un échantillon de 1,5 à 2,5 g est extrait par vortex pendant 1 minute en tube fermé avec 15 ml de solution EDTA 0,1 M (pH 5,2)-MeOH (4 /1). Le mélange est centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récolté. L'opération est répétée 9 fois. Tous les surnageants sont mélangés, centrifugés à 4000 g pendant 10 minutes. Un aliquot est acidifié avec de l'acide chlorhydrique à 5 M jusqu'au pH de 3,1-3,2. Ensuite, un aliquot de 3 ml est passé sur une colonne C₁₈ conditionnée avec 5 ml de MeOH et 5 ml d'eau. La colonne est nettoyée avec 5 ml d'eau, 5 ml de MeOH-H₂O (1 /3) puis 5 ml de MeOH- H₂O (1/3). Les fumonisines sont éluées avec 15 ml de MeOH. L'éluat est séché sous un courant d'azote à 60°C. Les résidus secs sont dissous dans du MeOH juste avant passage HPLC [82].

II.2.7. Etude comparative des techniques analytiques

Une étude comparative peut être menée afin de choisir un protocole pour notre étude.

Les méthodes décrites par les différentes études n'ont pas les mêmes applications.

- Chromatographie sur couche mince

Les techniques de chromatographie sur couche mince sont utilisées pour le dosage d'échantillons fortement contaminés ou le « screening » d'échantillons avant l'utilisation de techniques plus sensibles. Les limites de détection les plus basses permettent de détecter 0,1 µg/g de fumonisines dans le maïs. Les limites de détections de cette méthode ne sont pas suffisantes et font qu'elle n'est pas retenue pour notre travail.

- Techniques ELISA

Les techniques ELISA sont moyennement spécifiques et permettent l'obtention de résultats rapidement. Les limites de détection atteintes sont basses. La LD la plus intéressante obtenue par cette technique est obtenue sur la bière avec une LD de 0,003 µg/ml. Toutefois, selon les auteurs, les LD varient de 0,003 µg/ml à 0,1µg/ml. Un facteur 30 existe donc entre ces LD (facteur 30). La sensibilité est bonne mais la spécificité peu intéressante. Ce défaut de sensibilité est expliqué par des interactions entre FB1, FB2 et FB3. Cette technique n'est pas retenue dans le cadre de la recherche des fumonisines de notre projet.

- HPLC/ Fluorométrie

Les techniques HPLC/ Fluorométriques avec purification SAX donnent des LD assez homogènes selon les auteurs, de 0,01 µg/g à 0,26 µg/g sur matrice végétale (facteur 20). Par ailleurs, l'utilisation de l'OPA comme agent chromophore permet la détection la plus intéressante. Sur matrice liquide d'origine animale, l'utilisation de l'OPA permet la détection de 0,08 µg/ml au mieux (facteur 7 selon les auteurs pour les autres LD).

La purification des échantillons par passage sur colonne à immunoaffinité et dérivatisation à l'OPA diminue les LD à 0,003 µg/ml de lait. Un facteur 100

existe entre les LD déterminées par les différents auteurs. L'OPA reste l'agent de dérivatisation le plus largement utilisé pour la détection fluorométrique.

- Electrophorèse capillaire

L'utilisation de l'électrophorèse capillaire n'apporte pas d'amélioration sensible des LD obtenues par HPLC/ Fluorométrie. Les LD sont au mieux de 0,05 µg/g avec purification sur colonne à immunoaffinité. Cette technique n'apporte donc pas d'intérêt particulier par rapport à l'HPLC/ Fluorométrie et purification par passage sur colonne à immunoaffinité.

- HPLC/ SM

Les techniques utilisant une détection par spectrométrie de masse permettent d'obtenir une LQ de 0,0008 µg/g dans le maïs avec un marquage au deuterium. Les différentes techniques de détection par SM donnent des LD variant de 0,001 µg/g à 0,5 µg/g (facteur 200). La sensibilité de ces méthodes est importante par rapport à celle obtenue en HPLC/ Fluorométrie. Parmi les techniques de détection par SM, l'ES donne les LD les plus basses. Apparemment, le couplage de deux MS n'apporte pas d'amélioration significative (LD FAB-SM-SM = 0,005 µg/g < LD ES-SM = 0,001 µg/g). Le coût élevé de cet appareillage limite toutefois sa disponibilité.

- CG/ FAB-SM

LD obtenues avec la CG FAB-SM et marquage au deuterium sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par HPLC/ Fluorométrie soit 0,01g/g.

La technique retenue pour la détermination de FB1 dans le plasma, le foie et le muscle de canetons sera HPLC, dérivatisation OPA et détection fluorométrique. La méthode sera adaptée de celle décrite dans la norme AFNOR NF EN 1358 pour la recherche des FB1 dans le maïs. Les limites de détection correspondent aux valeurs que nous espérons pouvoir mettre en évidence. Nous n'utiliserons pas de colonne SAX de purification. Cette variante a précédemment été validée dans le laboratoire.

III Etude expérimentale

Le but de cette expérimentation est de déterminer la dose minimale de FB1 détectable dans le plasma, le foie et le muscle chez le caneton.

III.1. Matériel

Le matériel de laboratoire présent sur place consiste en des micropipettes Eppendorf (Eppendorf AG, Allemagne), des tubes Eppendorf de 2 ml, des seringues de 1 ml Codan (Codan AG, Allemagne), des aiguilles néolus 0,6 mm (Terumo, Belgique), des filtres à seringue de 4 mm avec une membrane de 0,45 μm (Gelmon Laboratory, USA).

Le pH-mètre utilisé vient de Technalab (Toulouse, France).

La pesée des réactifs chimiques est faite sur une balance de précision AJ 100 (Mettler, Toledo, Espagne). Les échantillons de tissus sont pesés sur une balance Sartorius BP 2100.

Une table d'agitation IKA Labortechnik est utilisée pour les 30 minutes d'agitation des échantillons.

La centrifugeuse GR 200 SX (Jouan) permet l'obtention du surnageant.

L'évaporation a lieu sous hotte (Astec, Alfortville, France) avec un courant d'azote.

Des tubes à hémolyse en verre, un Potter (5ml) N° AA72, un appareil Potter – Elvehjem avec piston sont utilisés pour le broyage des échantillons.

Système HPLC :

Une pompe M 2200 (Bischoff, Leonberg, Allemagne) est reliée à une colonne prontosil C₁₈ (porosité 5 μm , taille 250x 4,6 mm) (Bischoff chromatography, Leonberg, Allemagne). La pré-colonne placée en tête de colonne, de même nature que la colonne, provient du même fournisseur. La sortie de colonne est connectée au détecteur de fluorescence programmable RF 10A XL (Shimadzu, Kyoto, Japon) ainsi qu'à un système d'acquisition de données pic3 (ICS, Toulouse, France). La longueur d'onde d'excitation est de 335 nm et la longueur d'onde émise de 400 nm. Le débit adopté est de 1,1 ml/min.

L'injection de l'extrait dérivatisé se fait avec une seringue en verre de 100 μl (kloehn, Las Vegas, USA).

III.2. Réactifs et produits chimiques

Les solvants Acétonitrile et Méthanol sont fournis par Scharlau, Barcelone, Espagne.

L'O-phthaldialdéhyde (OPA), le 2 β -mercaptoéthanol (2 β ME), l'acide borique, le tétraborate de sodium et le standard de fumonisine B1 (CAS N° 116355-83-0) sont fournis par Sigma M.O., U.S.A. L'OPA et le standard de FB1 sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière.

L'eau utilisée dans les manipulations est distillée et déionisée au laboratoire.

La solution d'OPA décrite par la norme AFNOR NF EN 13585 nécessite l'injection de la molécule dérivatisée 2 minutes après sa préparation. Elle se réalise de la manière suivante :

40 mg d'OPA + 1 ml MeOH + 5 ml de tétraborate de sodium (0,1 mol/l) + 50 μ l de 2 β ME

La solution d'OPA que nous utilisons est différente de celle décrite par la norme. La stabilité de cette solution a été validée lors de manipulations préalables. Il est possible d'injecter la molécule dérivatisée 8 minutes après mise en solution. Elle se réalise de la manière suivante :

20 mg d'OPA + 10 ml ACN + 25 μ l 2 β ME

Les tampons borate pH 5,8 et 8,5 sont faits à partir de la norme AFNOR NF EN 13585.

Deux solutions sont préparées pour la préparation des tampons :

Solution A = Acide borique à 100 mM (618 mg d'Acide borique + 100 ml H₂O)

Solution B = Tétraborate de sodium à 100 mM (3,8 g + 100 ml H₂O)

- Tampon borate pH 5,8: 45 ml solution A + 5 ml solution B

- Tampon borate pH 8,5: 100 ml solution A + goutte à goutte solution B

La FB1 administrée aux canards a été produite et purifiée à l'ENVT par l'équipe de Mycologie. Les solutions administrées ont été analysées par CCM et HPLC.

III. 3. Animaux

20 canetons mulards mâles ont été utilisés. Leur poids initial moyen est de 600 g. Ils provenaient de la société Pyrénées Gascogne Aviculture (L'Isle Jourdain, France).

Les canetons ont été gavés à raison de 10 ml de solution de FB1/kg PV. Les doses administrées sont en fonction du poids vif des canetons (tableau II).

Tableau II : Doses de FB1 administrées PO en mg/kg PV

Doses théoriques mg/kg PV	Doses réelles mg/kg PV	Doses théoriques mg/kg PV	Doses réelles mg/kg PV
40	24	1,25	0,56
40	24	1,25	0,5
20	13.3	0,6	0,28
20	12	0,6	0,26
10	5	0,3	0,14
10	5	0,3	0,13
5	2,3	0,15	0,156
5	2,5	0,15	0,156
2,5	1,15	0	0
2,5	1,15	0	0

La différence entre les doses théoriques devant être administrées et les doses réelles provient du poids des canetons. Le protocole initial prévoyait en effet l'utilisation de canetons de 300 g.

III.3.1. Prélèvement des échantillons

Des échantillons d'au moins 2,5 ml de sang sont prélevés 2 heures après le gavage des canetons. Le délai de prélèvement correspond au Cmax estimé dans des études antérieures. Les prélèvements sont faits sur tube EDTA, le plasma est récupéré et congelé à -80°C en vue d'être analysé.

Les canetons sont sacrifiés suite à la prise de sang. Les organes (foie et muscle) sont récupérés et congelés à -80°C en attendant leur traitement.

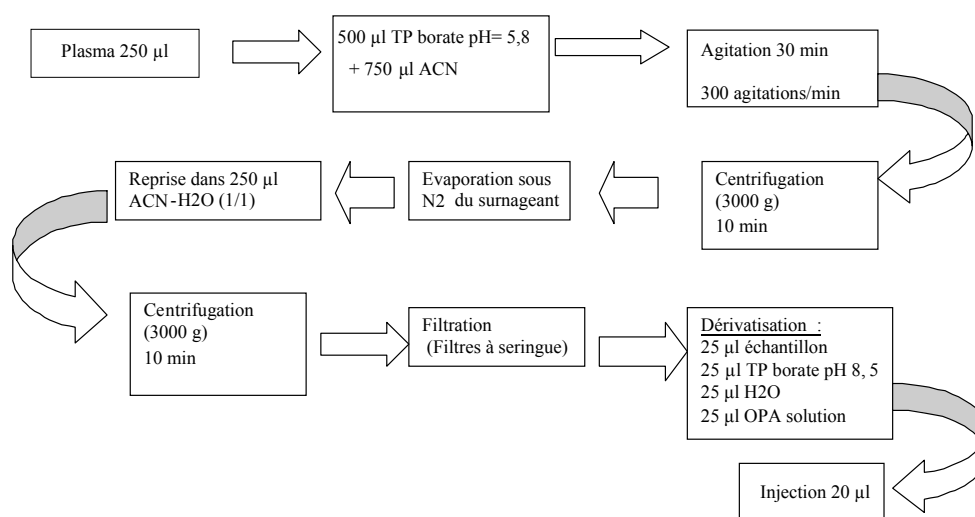
III.3.2. Traitement des échantillons

- Plasma

Pour chaque mesure, des aliquots de 250 µl de plasma sont utilisés. A ces 250 µl de plasma sont ajoutés 500 µl de tampon borate à pH= 5,8 et 750 µl d'ACN. La solution est agitée 30 minutes à 300 agitations par minute puis centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et évaporé sous courant d'azote. L'extrait sec est mis en solution dans 250 µl d'une solution d'ACN-H₂O (1/1) puis centrifugé 10 minutes à 3000 g. Le surnageant est récupéré et filtré avec un filtre à seringue. Les extraits peuvent être conservés au réfrigérateur à 4°C la nuit en attendant la dérivation et les mesures. Pour chaque échantillon, 25 µl d'extrait, 25 µl d'eau, 25 µl de TP Borate pH 8,5 et 25 µl d'OPA sont mis en solution. 20 µl de cette solution sont injectés en tête de colonne (Figure 4).

Figure 4: Représentation schématique du protocole de détermination de FB1 dans le plasma par HPLC

Détermination de FB1 dans le plasma par HPLC :

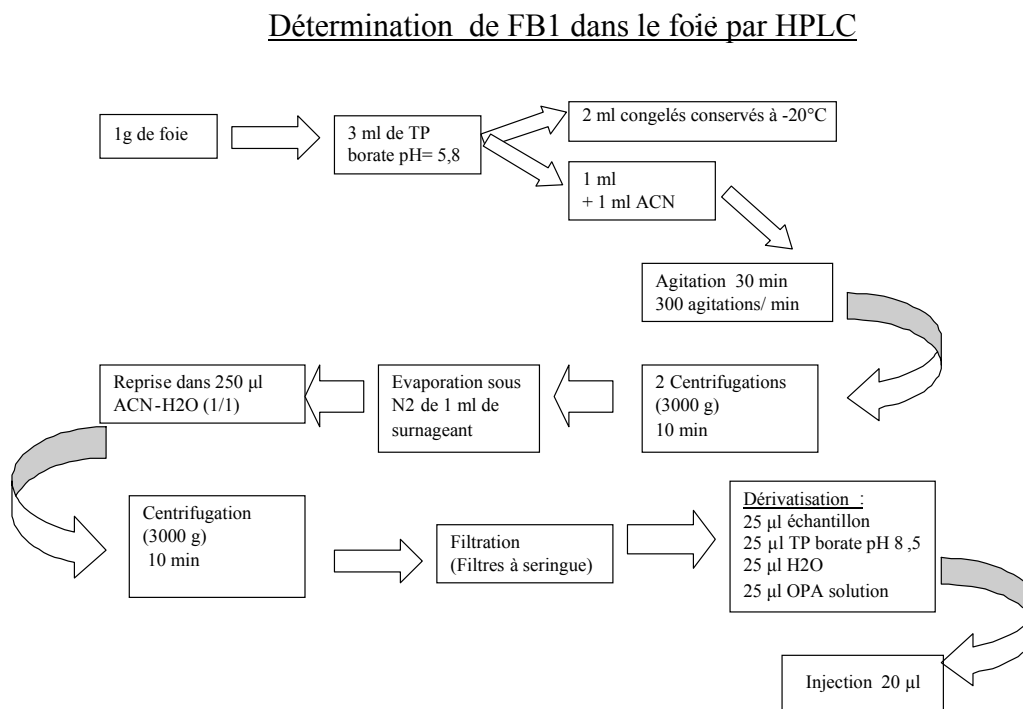


- Foie

Suite à une décongélation à température ambiante, des aliquots d'un gramme sont pesés avec une balance de précision. Un broyage au Potter téflon est réalisé à 500 tours/ minute dans 3 ml de tampon borate à pH= 5,8. Le broyat est mélangé à 3 ml d'ACN puis la solution est agitée 30 minutes à 300 agitations/minute, puis centrifugée 10 minutes à 3000 g. Le surnageant est récupéré et évaporé sous courant d'azote. L'extrait sec est remis en solution dans 250 µl d'ACN-H₂O (1/1), puis centrifugé 10 minutes à 3000 g. Le surnageant est filtré avec un filtre à seringue, les extraits sont conservés à 4°C la nuit en attendant le dosage. Pour chaque échantillon, 25 µl d'extrait, 25 µl d'eau, 25 µl de TP Borate pH 8,5 et 25 µl d'OPA sont mis en solution. 20 µl de cette solution sont injectés en tête de colonne (Figure 5).

Le signal obtenu à partir de certains échantillons provoquait une saturation du détecteur. Il a été décidé de pratiquer des dilutions au 1/2 ou au 1/10^{ème} tant que le signal obtenu n'était pas mesurable.

Figure 5: Représentation schématique du protocole de détermination de FB1 dans le foie par HPLC

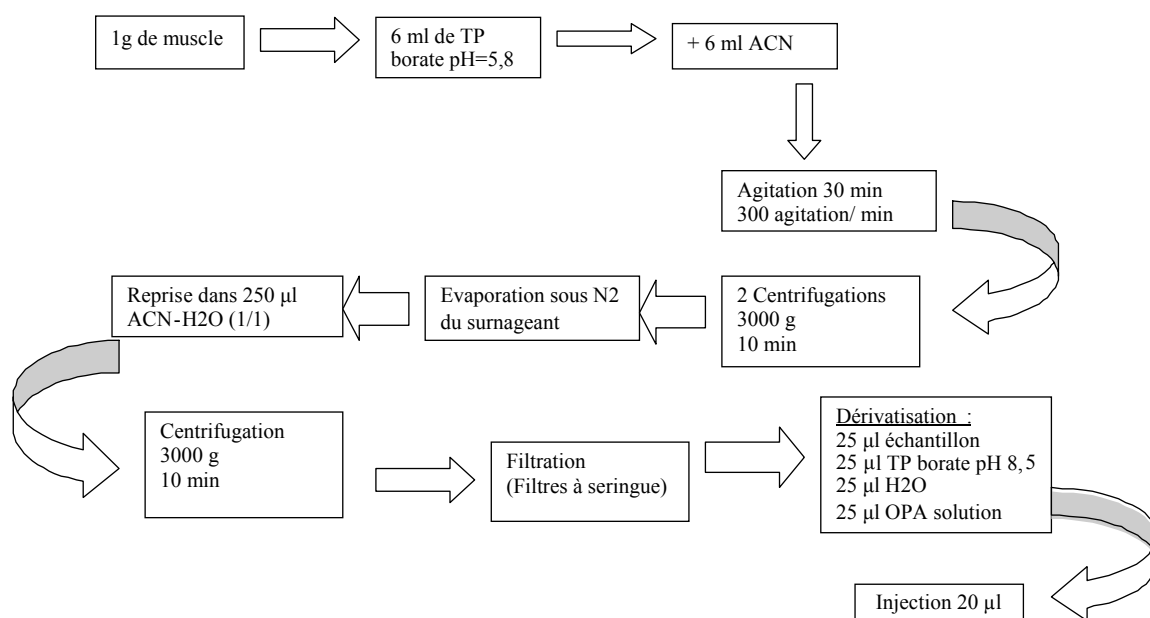


- Muscle :

Suite à une décongélation à température ambiante, des aliquotes d'un gramme sont pesés avec une balance de précision. Un broyage au Potter téflon est réalisé à 500 tours/ minute dans 6 ml de tampon borate à pH=5,8. Le broyat est mélangé à 6 ml d'ACN, puis la solution est agitée 30 minutes à 300 agitations/ minute et centrifugée 10 minutes à 3000 g. Le surnageant est récupéré et évaporé sous courant d'azote. L'extrait sec est remis en solution dans 250 µl d'ACN- H₂O (1/1), puis centrifugé 10 minutes à 3000 g, Le surnageant est filtré avec un filtre à seringue, les extraits sont conservés à 4°C la nuit en attendant le dosage. Pour chaque échantillon, 25 µl d'extrait, 25 µl d'eau, 25 µl de TP Borate pH 8,5 et 25 µl d'OPA sont mis en solution. 20 µl de cette solution sont injectés en tête de colonne (Figure 6).

Figure 6 : Représentation schématique du protocole de détermination de FB1 dans le muscle par HPLC.

Détermination de FB1 dans le muscle par HPLC :



III.4. Résultats-discussion

III.4.1. Validation de la méthode de dosage.

La méthode chromatographique est validée par passage de solutions standard. Une solution mère à 5 µg/ml est préparée à partir de FB1 fournie par Sigma. Les solutions étalon sont préparées à des concentrations connues à partir de cette dernière (tableau III). Le passage de blancs (solutions d'ACN-H₂O) permet de déterminer l'intensité du bruit de fond pour les solutions standard. En passant plusieurs solutions d'échantillons non contaminés, on peut déterminer les limites de détections dans les matrices concernées.

III.4.2. Méthode de calcul

Il est nécessaire de réaliser une étude de la réponse du détecteur en passant la série de solutions standard. A chaque solution, correspond un pic dont la surface est proportionnelle à la concentration. L'équation de la droite exprimant la réponse en fonction de la concentration permet de calculer par la suite les concentrations des échantillons.

III.4.3. Standards et gammes

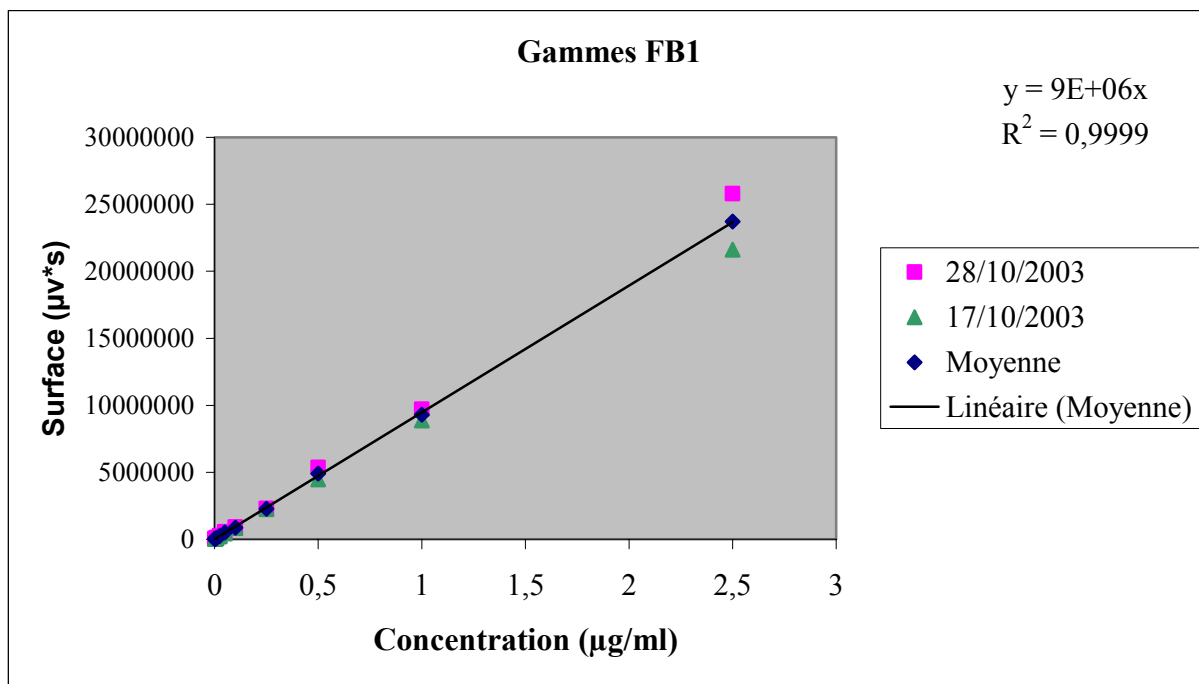
Les courbes d'étalonnage réalisées ont permis d'obtenir des valeurs moyennes pour les solutions standard répertoriées dans le tableau III.

Tableau III : Gammes de FB1

µg/ml FB1 std	Aire Moyenne	Ecart type	CV
0	14102	160	1,1
0,001	21552	3568	16,5
0,005	49233	6777	13,7
0,01	89885	25885	28,7
0,025	247258	29349	11,8
0,05	492150	76288	15,5
0,1	870580	51475	5,9
0,25	2266289	24348	1,1
0,5	4906620	631948	12,8
1	9292997	583657	6,2
2,5	23702422	2967688	12,5

Les gammes de FB1 sont représentées graphiquement sur la figure 7.

Figure 7 : Représentation graphique des gammes de FB1.



La courbe permet de mettre en évidence que la réponse du signal est linéaire.

III.4.4. Limites de détection et de quantification

Les limites sont estimées à partir de la gamme de FB1 faite à partir de solutions standard.

- On calcule la limite de détection :

$$LD = 2 \times \text{aire moyenne des blancs} + 2SD$$

$$LD = 2 \times 14102 + (2 \times 160) = 28204 + 320$$

On arrondit la LD à 30000 soit 0,002 µg/ml

- On calcule la limite de quantification :

$$LQ = 2LD \text{ soit } 0,004 \text{ µg/ml.}$$

III.4.5. Données obtenues sur les plasmas

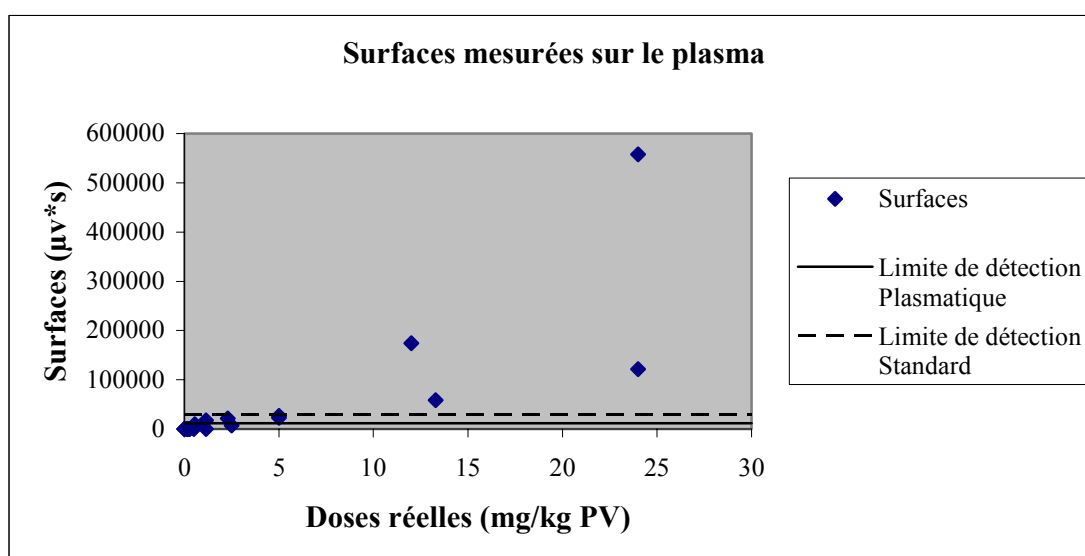
Le tableau IV répertorie les surfaces mesurées dans le plasma après administration par VO de FB1 à des canetons. Les concentrations en fumonisine sont obtenues en utilisant la droite de régression déterminée précédemment.

Tableau IV : Données obtenues sur le plasma

Doses réelles (mg/kg PV)	Surfaces	Doses réelles (mg/kg PV)	Surfaces
24	121677	0,56	3809
24	557452	0,5	0
13,3	58649	0,28	0
12	174101	0,26	0
5	26578	0,14	0
5	22594	0,13	0
2.3	21473	0,156	0
2.5	6873	0,156	0
1,15	17821	0	0
1,15	0	0	0

La relation entre surfaces mesurées et doses de FB1 administrées est présentée dans la figure 8.

Figure 8: Représentation graphique des surfaces mesurées sur les échantillons de plasma en fonction des doses réelles administrées.



L'analyse de la dispersion des résultats suggère que le « bruit de fond » dans les plasmas serait voisin de 12000. Cette valeur est inférieure à celle obtenue dans

les standards. Cette différence peut être expliquée par un effet « matrice ». Notre méthode d'intégration des pics peut aussi être différente de celle utilisée pour déterminer les gammes. L'interprétation de la LD calculée est difficile c'est pourquoi nous utiliserons la LD calculée sur standards pour la détermination des concentrations plasmatiques. Avec cette LD les surfaces supérieures ou égales à 30000 permettent d'interpréter les valeurs. Ainsi, seuls les échantillons 20 et 40 sont largement au-dessus de la LD. Leurs concentrations peuvent être calculées. La concentration en fumonisines dans les échantillons 10 est voisine de la LD.

III.4.6. Données obtenues sur les échantillons de foie.

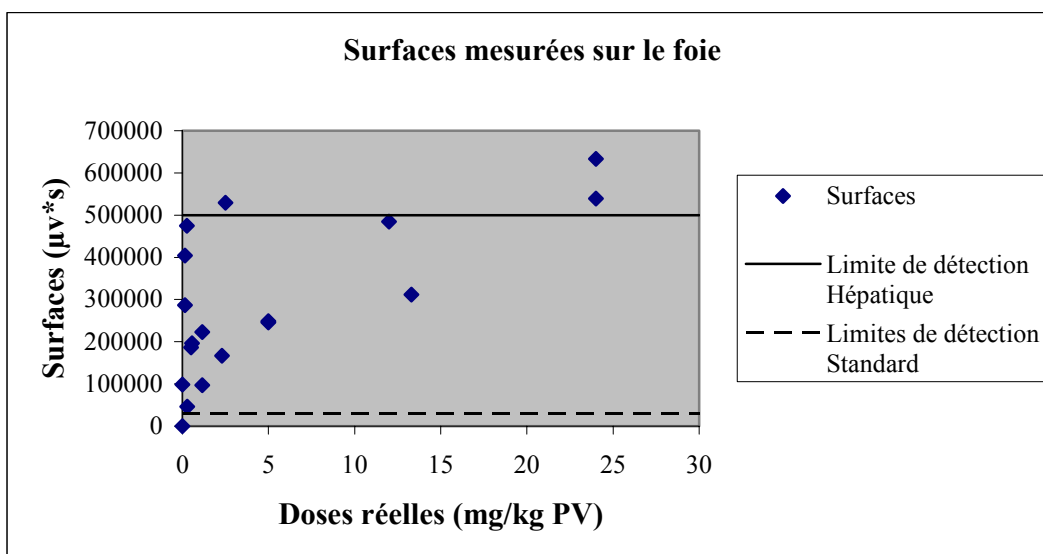
Le tableau V répertorie les surfaces mesurées dans le foie.

Tableau V : Données obtenues sur le foie

Doses réelles (mg/kg PV)	Surface	Doses réelles (mg/kg PV)	Surface
24	633303	1,15	222595
24	539519	0,56	196550
13,3	311557	0,5	186403
12	484759	0,28	46143
5	248929	0,26	474579
5	246010	0,156	286980
2,3	166524	0,156	404090
2,5	529481	0	98586
1,15	97279	0	0

La relation entre surfaces mesurées et doses de FB1 administrées est présentée dans la figure 9.

Figure 9 : Représentation graphique des surfaces mesurées sur les échantillons de foie en fonction des doses réelles administrées.



L'analyse de la dispersion des résultats suggère cette fois que le « bruit de fond » dans les foies est largement supérieur à celui obtenu dans les solutions standard. Il serait voisin de 500000. Ainsi, seules 2 surfaces mesurées peuvent être interprétables. Ces deux points correspondent aux animaux ayant reçu les plus fortes doses de FB1.

L'intensité du bruit de fond dans cette matrice montre que la technique ne convient pas à la recherche de fumonisines dans le foie. La purification des échantillons est insuffisante ou la technique de détection n'est pas assez sensible.

III.4.7. Données obtenues sur le muscle.

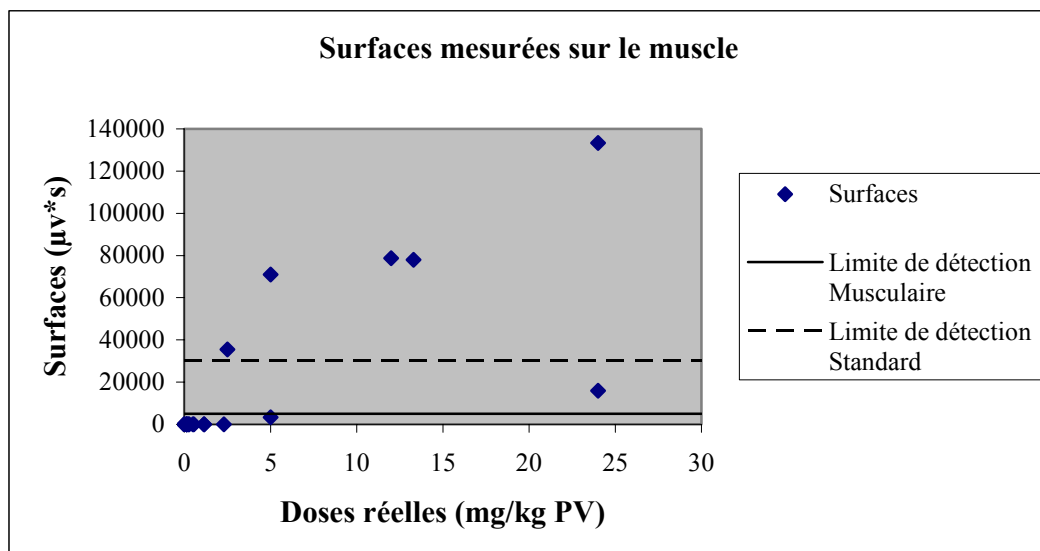
Les surfaces mesurées dans le muscle sont répertoriées dans le tableau VI.

Tableau VI : Données obtenues sur le muscle.

Doses réelles (mg/kg PV)	Surfaces	Doses réelles (mg/kg PV)	Surfaces
24	15924	0,56	0
24	133328	0,5	0
13,3	77960	0,28	0
12	78760	0,26	0
5	3325	0,14	0
5	71004	0,13	0
2,3	0	0,156	0
2,5	35454	0,156	0
1,15	0	0	0
1,15	0	0	0

La relation entre les surfaces mesurées et les doses de FB1 administrées est représentée dans la figure 10.

Figure 10 : Représentation graphique des surfaces mesurées sur les échantillons de muscle en fonction des doses réelles administrées.



Comme pour les plasmas, l'analyse de la dispersion des résultats suggère que le « bruit de fond » dans le muscle est inférieur au « bruit de fond » dans les solutions standards. Il serait voisin d'une surface de 5000. Là encore, l'explication de cette différence pourrait être imputable à la matrice. Notre

manière d'intégrer les pics est peut-être également différente de celle utilisée pour la détermination des gammes. En l'absence de précision sur l'origine de ce résultat, la LD déterminée sur les solutions standard est utilisée pour déterminer les surfaces interprétables dans le muscle. Ainsi, 5 surfaces permettent de déterminer les concentrations musculaires.

III.4.8. Répartition de la FB1 dans les différentes matrices.

Les concentrations en FB1 pouvant être mesurées dans cette étude sont répertoriées dans le tableau VII.

Tableau VII : Concentrations en FB1 déterminées dans le plasma, le foie et le muscle.

	Plasma				Foie		Muscle			
Doses réelles (mg/kg PV)	24	24	13,3	12	24	24	24	24	13.3	12
Concentrations	12,17	55,74	5,86	17,41	86	73	nd	6,79	3,79	4,01
	ng/ml				ng/g					

L'analyse des résultats révèle que les concentrations dans le foie sont largement supérieures aux concentrations obtenues dans le plasma. En revanche, les concentrations musculaires sont toujours inférieures à celles rencontrées dans le plasma. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus dans les autres espèces animales et nos travaux antérieurs chez le canard à fortes doses.

IV. Conclusion et perspectives

En conclusion, la méthode utilisée pour déterminer de faibles doses de FB1 dans les denrées d'origine animale n'est pas utilisable telle quelle. Les réponses du signal permettent d'exprimer avec précision des concentrations en FB1 dans le plasma et le muscle supérieures à 4 ng/ml et 4 ng/g respectivement. Ces concentrations ne sont atteintes qu'à de fortes doses de FB1 administrées par voie orale. En ce qui concerne le foie, d'importantes interférences amènent la LD à 50 ng/g. Cette LD élevée rend impossible la détermination de teneurs en FB1 lors d'exposition à de faibles doses. Les résultats nous amènent à proposer une amélioration de la méthode de dosage utilisée. Plusieurs points pourront être étudiés tels que le changement de réactif de dérivation ou l'utilisation de colonnes de purification.

Bibliographie

1. Soriano J., Dragacci S. - *Occurrence of fumonisins in food.* - Food research Intern. 2004, **37**, 985-1000.
2. Abbas H., Gelderblom W., Cawood M., Shier W. - *Biological activities of fumonisins mycotoxins from fusarium moniliforme, in Jimsonweed (datura stramonium L) and mammalian cells cultures.*- Toxicol. 1993, **31**, 345-353.
3. Thibault N.- *Les fumonisines: nature, origine et toxicité.*- Thèse ENVT 1997. 136 p.
4. Ramasamy S., Wang E., Hennig B., Merrill A.- *Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture.*- Toxicol. Appl. Pharmacol. 1995, **133**, 343-348.
5. Merrill A., Van Etchen G., Wang E., 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.
6. Voss K., Chamberlain W., Bacon C., Herbert R., Walters D., Norred W. - *Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B1 in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats.* - Fund. Appl. Toxicol. 1995, **24**, 102-110.
7. JECFA, IPCS INCHEM., (21/10/2003),- *Fumonisin*- (en ligne) adresse URL : <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm>
8. WHO-IARC. - *Toxins derived from Fusarium moniliforme Fumonisin B1 and B2 and fusarium C.* - Lyon (F): IARC. 1993.
9. Soriano J., Dragacci S. - *Intake, decontamination and legislation of fumonisin in foods.* - Food research Intern. 2004, **37**, 367-374.
10. Shephard G., Thiel P., Sydenham E., Alberts J.- *Biliary excretion of the mycotoxin fumonisin B1 in rats.*- Food. Chem. Toxicol. 1994, **32**, 489-491.
11. Caloni F., Spotti M., Pompa G., Zucco F., Stamatii A., De Angeli I.- *Evaluation of fumonisin B1 and its metabolites absorption and toxicity on intestinal cells line.*- Toxicol. 2002, **40**, 1181-1188.
12. Hopmans E., Hauck C., Hendrich S., Murphy P.- *Excretion of fumonisin B1, Hydrolysed fumonisin B1, and the fumonisin B1-fructose adduct in rats.*- J. Agric. Food Chem. 1997, **45**, 2618-2625.
13. Shephard G., Thiel P., Sydenham E.- *Initial studies of the toxicokinetics of fumonisin B1, in rats.*- Food Chem. Toxic. 1992, **30**, 277-279.

14. Prelusky D., Miller J., Trenholm H. - *Disposition of 14C-labelled residues of pigs fed radiolabelled fumonisin B1*. - Food Add. Contam. 1996, **13**, 155-162.
15. Shephard G., Thiel P., Sydenham E., Savard M.- *Fate of a single dose of 14C-labelled fumonisin B1 in vervet monkeys*.- Nat. Toxins, 1995, **3**, 591-595.
16. Prelusky D., Savard M., Trenholm H.- *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.
17. Smith J.S., Thakur R.A. - *Occurrence of fumonisins in beef*. - Adv.Exp. Med. Biol. 1996, **392**, 39-55.
18. Caloni F., Spotti M., Auerbach H. Op den Camp H., Gremmels J., Pompa G. - *In vitro metabolism of fumonisin by ruminal microflora*. - Vet. Res. Commun. 2001, **24**, 379-387.
19. Vudathala D., Prelusky D., Ayroud M., Trenholm H., Miller J.- *Pharmacokinetic fate and pathological effects of 14C-fumonin B1 in laying hens*.- Nat.Toxins. 1994, **2**, 81-88.
20. Prelusky D., Trenholm H., Savard M.- *Pharmacokinetic fate of 14C-labeled fumonisin B1 in swine*.- Natural Toxins. 1994, **2**, 73-80.
21. Scott P., Delgado T., Prelusky D., Trenholm H., Miller J.- *Determination of fumonisins in milk*.- J. Environ. Sci. Health B. 1994, **29**, 989-998.
22. Voss K., Riley R., Bacon C., Chamberlain W., Norred W.- *Subchronic toxic effects of Fusarium moniliforme and fumonisin B1 in Rats and mice*.- Nat. Toxins. 1996, **4**, 16-23.
23. Wang E., Ross P., Wilson T., Riley R., Merrill A.- *Increases in serum sphingosine and sphinganin and decreases in complex sphingolipids in ponies feed containing fumonisins mycotoxins produced by Fusarium moniliforme*.- J. Nutr. 1992, **122**, 1706-1716.
24. Shephard G., Thiel P., Sydenham E.- *Determination of fumonisin B1 in plasma and urine by high performance liquid chromatography*.- J. Chromatogr. 1992, **32**, 299-304.
25. Norred W., Plattner R., Chamberlain W.- *Distribution and excretion of 14C-fumonisin B1 in male Sprague-Dawley rats*.- Nat. Toxins. 1993, **1**, 341-348.
26. Martinez-Larranaga M., Anadon A., Diaz M., Fernandez-Cruz M., and al.- *Toxicokinetic and oral bioavailability of fumonisin B1*.- Vet. Hum. Toxicol. 1999, **41**, 357-362.

27. Dantzer W., Mullin J., Hendrich K., Murphy P.- *Excretion Of 14C-Fumonisin B1, 14C-Hydrolysed fumonisin B1 and 14C-Fumonisin B1-fructose in rats.- J. Agrdi. Food Chem.* 1999, **47**, 4291-4296.
28. Merrill A. Jr., Morgan E., Kikolova-Karashian M., Stewart J.- *Sphingomyelin hydrolysis and regulation of the expression Of the gene for cytochrome P450. - Biochem. Soc. Trans.* 1999, **27**, 383-387.
29. Riley RT., Yoo H.S. - *Time and dose relationship between the cellular effects of fumonisin B1 (FB1) and the uptake and accumulation of ¹⁴C-FB1 in LLC-PK1 cells. - Toxicologists*, 1995, **15**, 290.
30. Enongene N., Sharma P., Bhandari N., Voss A., Riley T.- *Disruption of sphingolipid metabolism in small intestine liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B1. Food Chem. - Toxicol.* 2000, **38**, 793-799.
31. Cawood M., Gelderblom W., Alberts J., Snyman S. - *Interaction of 14C-labelled fumonisin B mycotoxins with primary rat hepatocyte cultures. - Food Chem. Toxic.* 1994, **32**, 627-632.
32. Riley R., Voss K., Norred W., Wang E., Merrill A., Jr.- *Fumonisin: mechanism of mycotoxicity.. Rev. Med.Vet. - 1998*, **149**, 617-626.
33. Shephard G., Snijman P. - *Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate. - Food Chem. Toxicol.* 1999, **37**, 111-116.
34. Scott P., Delgado T., Prelusky D., Tremholm H., Millre J. - *Determination of fumonisins in milk.- J. Environ. Sci. Health B.* 1994, **29**, 989-998.
35. Spotti M., Caloni F., Fracchiolla L., 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.
36. Sydenham E., Shephard G., Thiel P.- *Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds.- J. AOAC Inter.,* 1992, **75**, 313.
37. Sydenham E., Van Der Westhuizen L., Stockenstrom S. - *Fumonisin-contaminated maize: physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments.- Food Addit. Contam.* 1994, **11**, 25-32.
38. Sydenham E., Shephard G., Thiel P., Marasas W., Stockenstrom S. - *Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs.- J. Agric. Food Chem.* 1991, **39**, 2014-2018.

39. Rottinghaus G., Coatney C., Minor H.- *A rapid, sensitive thin-layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2.*- J. Vet. Diagn. Invest. 1992, **4**, 326-329.
40. Stockenstrom S., Sydenham E., Thiel P.- *Determination, of fumonisins in corn: evaluation of two purification procedures.*- Mycotoxin Res. 1994, **10**, 9-14.
41. Bennet G., Richard J. - *Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxaldehyde derivative of fumonisines.* - J. AOAC Intern. 1994, **77**, 501-506.
42. Dupuy J.- *Principales mycotoxines produites par des souches de Fusarium isolées de céréales.*- Thèse ENVT 1994. 229p
43. Truckess M., Stack M., Allen S., Barrion N.- *Immunoaffinity column coupled with liquid chromatography for the determination of FB1 in canned and frozen sweet corn.*- J. AOAC Intern. 1995, **78**, 705-710.
44. Shephard G., Sydenham E., Thiel P., Gelderblom W.- *Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.*- Journal of liquid chromatography. 1990, **13**, 2077-2087.
45. Azcona-Oliveira J., Abouzied M., Pattner R., Pestka J.- *Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B1, B2 and B3.*- J. Agric. Food Chem. 1992, **40**, 531-534.
46. Azcona-Oliveira J., Abouzied M., Pattner R., Norred W., Pestka J.- *Generation of antibodies reactive with fumonisins B1, B2 and B3 by using cholerae toxin as the carrier-adjuvant.*- Applied Environ. Microbiol. 1992, **58**, 169-173.
47. Ono E., Ono M., Funo F., Medinal A., Oliveira T., Kawamura O.- *Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA.*- Food Add. Contam. 2001, **18**, 719-129.
48. Sydenham E., Gelderblom W., Thiel P., Marasas W.- *Evidence of the natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by Fusarium moniliforme, in corn.*- J. Agric. Food. Chem. 1990, **38**, 285-290.
49. Dupuy J., Le Bars P., Le Bars J., and Boudra H. - *Determination of FB1 in corn by instrumental thin layer chromatography.* - J. Planar. Chromatogr. 1993, **6**, 476-480.
50. Pitet A., Parisod V., Schellenberg M.- *Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn-based products from the swiss market.*- J. Agric. Food Chem., 1992, **40**, 1352-1354.

51. Plattner R., Ross P., Reagor J., Stedelin J., Rice L.- *Analysis of corn and cultured corn for fumonisin B1 by HPLC and GC/MS by 4 laboratories.*- J. Vet. Diagn. Invest. 1991, **3**, 357-358.
52. Plattner R., Weiseleder D., Shackelford D., Peterson R., Powell R.- *A new fumonisin form solid cultures of fusarium moniliforme.*- Mycopathologia. 1992, **117**, 23-28.
53. Plattner R., Branham B.- *Labelled fumonisins: Production and use of the fumonisins B1 containing stable isotopes.*- J. AOAC Int. 1994, **75**, 525-532.
54. Cawood M. - *Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach.* - J. Agric. Food. Chem. 1991, **39**, 1958-1962.
55. Akiyama H., et al. - *Liquid chromatographic determination of fumonisin B1 and B2 in corn by precolumn derivatisation with 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F).*- J. Food Hyg. Soc. Japan. 1995, **36**, 77-81.
56. Akiyama H., Miyahara M., Toyoda M., Saito Y. - *Comparison of several fluorescence HPLC methods for fumonisin analysis.* - Eisei Shikenjo Hodoku. 1994, **112**, 112-117.
57. Ross P., Rice L., Plattner R., Osweiler G., Wilson T., Owens D., Nelson H., Richard J.- *Concentrations of fumonisin B1 in feeds associated with animal health problems.*- Mycopathologia. 1991, **114**, 129-135.
58. Wilson T., Ross P., Rice L., Osweiler G., Nelson H., Owens D., Plattner P., Recciardo C., Noon T., Picknell J.- *Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leuco encephalomalacia.*- J. Vet. Diagn. Invest. 1990, **2**, 213-216.
59. Shephard G., Thiel P., Stockenstrom S., Sydenham E.- *Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based food products.*- J. AOAC Int. 1996, **79**, 671-677.
60. Ware G., Francis O., Kuan S., Umrigar P., Carman A., Carter L., Bennett G. - *Determination of fumonisin B1 in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.* - Anal. Lett. 1993, **26**, 1751.
61. Maragos C., Richard J. - *Quantification and stability of fumonisins B1 and B2 in milk.* - J. Assos. Off. Anal. Chem. 1994, **77**, 1162-1167.
62. Scott P., Lawrence G.- *Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzo-furazan.*- J. AOAC. Inter. 1992, **75**, 829.

63. Holcomb M., Thompson H. Jr., Hankins L.- *Analysis of fumonisin B1 in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization and fluorescence detection.*- J. Agric. Food Chem. 1993, **41**, 764-767.
64. Velazquez C., van Bloemendal C., Sanchis V., Canela J.- *Derivatisation of fumonisin B1 and B2 with 6-aminoquinolyl N-hydroxysuccinimidylcarbamate.*- Agric. food Chem. 1995, **43**, 1535-1537.
65. Visconti A., Boenke A., Solfrizzo M., Pascale M., Doko M.- *European intercomparison study for the determination of fumonisins content in two maize materials.*- Food Addit. Contam. 1996, **13**, 909-927.
66. Plattner R., Weisleder D., Poling S.- *Analytical determination of fumonisins and other metabolites produced by Fusarium moniliforme and related species on corn.*- Adv. Exp. Med. Biol. 1996, **392**, 57-64.
67. Duncan K., Kruger S., Zabe N., Kohn B., Prioli R.- *Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2 and B3.*- J. Chromatogr. A. 1998, **815**, 41-47.
68. Korfmaker W., Chiarelli M., Lay J. Jr, Bloom J., Holcomb M., McManus K.- *Characterization of the mycotoxin fumonisin B1: comparison of thermospray, fast atom bombardment and electrospray mass spectrometry.*- Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991, **5**, 463-468.
69. Lukacs K., Schaper S., Herderich M., Humpf H.U.- *Identification and determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn products by high-performance liquid chromatography-electrospray-ionisation tandem mass spectrometry.*- Chromatographia. 1996, **43**, 124-128.
70. Mirocha C., Gilchrist D., Shier W., Abbas H., When Y., Vesonder R. *Mycopathologia.* 1992, 117, 47.
71. Doergue D., Howard P., Bajic S., Preece S.- *Determination of fumonisins using on-line liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry.*- Rapid Comm. Mass Spectrom. 1994, **8**,603-606.
72. Churchwell M., Cooper W., Howard P., Doerge D.- *Determination of fumonisins in rodent feed using HPLC with electrospray mass spectrometric detection.*- J. Agric. Food Chem. 1997, **45**, 2573-2578.
73. Thakur R., Smith J. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1994, 8, 82.
74. Royer D., Humpf H.U., Guy P.A.- *Quantitative analysis of fusarium mycotoxin in maize using accelerated solvent extraction before liquid*

- chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry.*- Food Addit. Contam. 2004, **21**, 678-692.
75. Wilkes J., Sutherland J., Churchwell M., Williams A.- *Determination of fumonisin B1, B2 and B3 by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection.*- J. Chromatogr. A. 1995, **695**, 319-323
76. Holcomb M., Thomson H. Jr. - *Analysis of fumonisin B1 in rodent feed by CE with fluorescence detection of the FMOC derivative.* - J. Capillary Electrophoresis. 1996, **3**, 205-208.
77. Hines H., Brueggeman E., Holcomb M., Holder C. - *Fumonisin B1 analysis with capillary electrophoresis-electrospray ionisation mass spectrometry.*- Rapid communication in Mass Spectrometry. 1995, **9**, 519-524.
78. Maragos C., Plattner R., Miklasz S. - *Determination of hydrolysed fumonisin B1 (HFBI) in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay.* - Food Add. Contam. 1996, **13**, 105-113.
79. Ware G., Umrigar P., Carman A. Jr., Kuan S.- *Evaluation of Fumonitest immunoaffinity columns.*- Anal. Lett. 1994, **27**, 693-715.
80. Holcomb M., Thompson H. Jr., Lipe G., Hankins L. J. Liq. Chromatogr. 1994, **17**, 4121.
81. Karuna R., Sashidbar R.B.- *Use of ion-exchange chromatography coupled with TLC-laser scanning densitometry for the quantification of fumonisin B1.*- Talanta. 1999, **50**, 381-389.
82. Shephard G. - *Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins.*- J. Chromatogr. A. 1998, **815**, 31-39.
83. Shetty P., Bhat R. - *Sensitive method for the detection of fumonisin B1 in human urine.* - J. Chromatogr. B. 1998, **705**, 171-173.
84. Jimenez M., Mateo R.- *Determination of mycotoxins produced by Fusarium isolated from banana fruits by capillary gas chromatography and high performance liquid chromatography.*- J. Chromatogr. A. 1997, **778**, 363-372.
85. Scudamore K., Hetmanski M., Naylor J., Rainbird S.- *Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and high performance liquid chromatography.*- Food Addit. Contam. 1997, **14**, 175-186.
86. Kim E., Maragos C., Kendra D.- *Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in corn silage.*- J. Agric. Food Contam. 2004, **52**, 196-200.

87. Visconti A., Solfrizzo M., De Grolamo A. - *Determination of fumonisin B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column clean up: collaborative study.* - J. AOAC. Intern. 2001, **84**, 1828-1837.
88. Torres M., Sanchis V., Ramos A.- *Occurrence of fumonisins in Spanish beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method.*- Int. J. Food Microbiol. 1998, **39**, 139-143.