

MISE AU POINT ET APPLICATION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA FUMONISINE B1 DANS LES MATRICES CARNEES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Aliénor, Jeanne, Isabelle AUBY
Née, le 4 Novembre 1982 à BORDEAUX (Gironde)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Philippe GUERRE**

JURY

PRESIDENT :
M. Gérard CAMPISTRON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Philippe GUERRE
M. Jean-Luc GUERIN

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

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PÊCHE
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

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

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. BRAUN Jean-Pierre, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. CABANIE Paul, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. DARRE Roland, *Productions animales*
- M. DORCHIES Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. EUZEBY Jean, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- 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. CORPET Denis, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. DELVERDIER Maxence, *Anatomie pathologique*
- M. ENJALBERT Francis, *Alimentation*
- M. FRANC Michel, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. HENROTEAUX Marc, *Médecine des carnivores*
- M. MARTINEAU Guy-Pierre, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*
- M. PETIT Claude, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. REGNIER Alain, *Physiopathologie oculaire*
- M. SAUTET Jean, *Anatomie*
- M. SCHELCHER 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. DUCOS Alain, *Zootéchnie*
- M. DUCOS de LAHITTE Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. GUERRE Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme HAGEN-PICARD Nicole, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme KOLF-CLAUW Martine, *Pharmacie - Toxicologie*
- M. LEFEBVRE Hervé, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. LIGNEREUX Yves, *Anatomie*
- M. PICAUVET Dominique, *Pathologie infectieuse*

INGENIEUR DE RECHERCHES

- M. TAMZALI Youssef, *Responsable Clinique équine*

PROFESSEURS CERTIFIÉS 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*

MAÎTRES 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, *Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles*
M. JACQUIET Philippe, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. JAEG Jean-Philippe, *Pharmacie et Toxicologie*
M. LYAZRHI Faouzi, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. MATHON Didier, *Pathologie chirurgicale*
M. MEYER Gilles, *Pathologie des ruminants*
Mme MEYNADIER-TROEGELER Annabelle, *Alimentation*
M. MONNEREAU Laurent, *Anatomie, Embryologie*
Mme PRIYMENKO Nathalie, *Alimentation*
Mme RAYMOND-LETRON Isabelle, *Anatomie pathologique*
M. SANS Pierre, *Productions animales*
Mlle TRUMEL Catherine, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VERWAERDE Patrick, *Anesthésie, Réanimation*

MAÎTRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mlle BIBBAL Delphine, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
M. CASSARD Hervé, *Pathologie du bétail*
Mlle LACROUX Caroline, *Anatomie pathologique des animaux de rente*
M. NOUVEL Laurent-Xavier, *Pathologie de la reproduction*
M. REYNOLDS Brice, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*
M. VOLMER Romain, *Infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. CONCHOU Fabrice, *Imagerie médicale*
M. CORBIERE Fabien, *Pathologie des ruminants*
M. MOGICATO Giovanni, *Anatomie, Imagerie médicale*
Mlle PALIERNE Sophie, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. RABOISSON Didier, *Productions animales*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le professeur Gérard CAMPISTRON,

Professeur des universités
Praticien hospitalier
Génétique

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le professeur Philippe GUERRE,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pharmacie toxicologie

Qui nous a confié ce travail et guidé dans son élaboration
Sincère reconnaissance.

A Monsieur le docteur Jean-Luc GUERIN,

Maître de conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Elevage et Santé Avicoles et Cunicoles

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

A Monsieur le docteur Didier TARDIEU

Docteur de l'institut National Polytechnique de Toulouse

Qui nous a guidé dans l'élaboration de ce travail, pour ses conseils et ses encouragements,
Sincère reconnaissance.

A Tous les gens que j'aime, que j'ai aimés et que j'aimerai...

TABLE DES MATIERES.

TABLE DES MATIERES.....	1
Introduction Générale	3
Partie I : Mise au point d'une méthode d'extraction et de purification de la FB1 dans le foie	7
1. INTRODUCTION : LES METHODES DE DOSAGE DE LA FB1.....	7
2. MATERIELS ET METHODES.....	11
2-1. Matériels	11
2-1-1. Consommables.....	11
2-1-2. Standard.....	11
2-1-3. Système HPLC.....	11
2-1-4. Solvants et réactifs.....	12
2-1-5. Préparation des solutions.....	12
2-1-6. Appareillage.....	13
2-2. Extraction et purification de la FB1 dans le foie	13
2-2-1. Extraction et purification par colonnes SAX.....	13
2-2-2. Extraction et purification par colonnes d'immunoaffinité.....	16
2-3. Dosage et quantification	20
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	20
3-1. Extraction et purification par colonnes SAX	20
3-1-1. Application de la méthode mise au point sur le plasma au foie.....	20
3-1-2. Influence de la composition de la solution de broyage.....	21
3-1-3. Influence du lavage.....	22
3-1-4. Influence de la composition de la solution d'élution.....	24
3-1-5. Influence de l'introduction de tensioactifs.....	24
3-2. Extraction et purification par colonnes d'immunoaffinité	26
3-2-1. Essai de 4 méthodes d'extraction.....	26
3-2-2. Optimisation de l'élution.....	27
4. CONCLUSION : SELECTION D'UNE METHODE DE DOSAGE DANS LE FOIE..	28
Partie II : Validation d'une méthode de dosage de la FB1 dans le foie, le rein et le muscle de canard et application après administration orale à différentes doses	29
1. INTRODUCTION : TOXICOCINETIQUE DE LA FB1 CHEZ L'ANIMAL.....	29
2. MATERIELS ET METHODES.....	31
2-1. Matériels	31
2-2. Traitement des animaux	31
2-3. Méthode de dosage de la FB1	32
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	34
3-1. Validation de la méthode de dosage	34
3-1-1. Linéarité.....	34
3-1-2. Limites de détection et de quantification.....	35
3-1-3. Précision.....	35
3-1-4. Pourcentage d'extraction.....	36
3-2. Dosage de la fumonisine B1 dans le foie, les reins et les muscles de canard après administration orale à différentes doses	37
3-2-1. Détermination de la plus faible dose orale détectable dans les organes.....	38
3-2-2. Représentations graphiques.....	39
3-2-3. Ratios des concentrations tissulaires en FB1 en fonction des concentrations plasmatiques.....	42
3-2-3. Conclusion.....	44
Conclusion générale	45
BIBLIOGRAPHIE	46

TABLE DES ILLUSTRATIONS.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Techniques de dosages de la fumonisine B1	8
Tableau 2: Critères statistiques de validation de la méthode de dosage	10
Tableau 3: Variations de composition de la solution de broyage (colonnes SAX)	16
Tableau 4: Variations de quantité et de composition de la solution de lavage (colonnes SAX)	16
Tableau 5: Variation de la composition de la solution d'élution (colonnes d'immunoaffinité)	19
Tableau 6: Influence de la composition du solvant d'extraction (colonnes SAX)	21
Tableau 7: Influence de la composition et du volume de solution de lavage (colonnes SAX)	22
Tableau 8: Influence de la composition de la solution d'élution (colonnes SAX)	24
Tableau 9: Influence de l'utilisation de tensioactifs sur l'extraction (colonnes SAX)	25
Tableau 10: Influence de la composition de la solution d'élution (colonnes d'immunoaffinité)	27
Tableau 11: Comparaison de l'utilisation de colonnes SAX et d'immunoaffinité pour l'extraction et la purification	28
Tableau 12: Absorption de la FB1 après administration par voie orale en fonction des espèces	29
Tableau 13: Distribution de la FB1 après administration par voie orale en fonction des espèces	30
Tableau 14: Doses de FB1 administrées par voie orale et poids des canards	32
Tableau 15 : Linéarité de la méthode de dosage	35
Tableau 16: Répétabilité et reproductibilité de la méthode de dosage	36
Tableau 17: Détermination du pourcentage d'extraction	37
Tableau 18: Validation de la méthode de dosage appliquée aux reins et aux muscles	37
Tableau 19: Dosage de la FB1 dans les échantillons de foie, de rein et de muscle	38
Tableau 20: Ratios des concentrations tissulaires en fumonisine en fonction des concentrations plasmatiques	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure générale des fumonisines	4
Figure 2: Voies de biosynthèse des sphingolipides	4
Figure 3: Schéma de la réaction de dérivatisation	12
Figure 4: Mise au point d'une méthode d'extraction et de purification avec colonnes échangeuses d'ions	14
Figure 5: Mise au point d'une méthode d'extraction et de purification avec colonne d'immunoaffinité	18
Figure 6: Comparaison du chromatogramme d'un standard non traité (A) et du chromatogramme d'un échantillon dont le lavage a été réalisé avec 2mL de mélange tampon 5,8/MetOH (1/3) (B)	23
Figure 7: Comparaison du chromatogramme de l'échantillon témoin (A) et du chromatogramme de l'échantillon traité avec du twin (B)	25
Figure 8: Pourcentage d'extraction et chromatogramme type obtenus par passage des échantillons de foie sur colonnes d'immunoaffinité	26
Figure 9: Procédés d'extraction, de purification et de dosage de la FB1 dans le foie, les reins et les muscles	33
Figure 10: Représentation graphique de la surface obtenue en fonction de concentrations croissantes	34
Figure 11: Concentrations hépatiques en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale	39
Figure 12: Concentrations plasmatiques en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale	40
Figure 13: Concentrations rénales en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale	41
Figure 14: Concentrations musculaires en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale	42

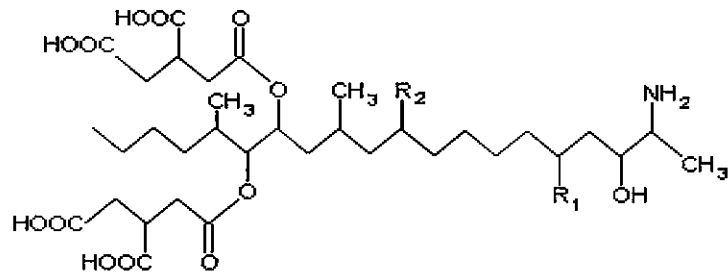
Introduction Générale

Les mycotoxines sont des composés issus du métabolisme secondaire des moisissures. La Food and Agriculture Organisation (FAO) a rapporté en 1985 que 25 % des récoltes de céréales dans le monde étaient affectées par des mycotoxines [1]. Leur présence entraîne une diminution de la qualité et de la disponibilité en volume des grains récoltés. Des diminutions des performances zootechniques des animaux peuvent également être observées lors d'intoxications chroniques. Enfin, les mycotoxines sont responsables d'intoxications aiguës parfois mortelles, notamment chez les animaux d'élevage.

La fumonisine B1 (FB1) est majoritairement produite au champ par les champignons du genre *Fusarium*, le principal étant *Fusarium verticillioides*. C'est une moisissure cosmopolite, rencontrée dans les régions chaudes et humides, tempérées et subtropicales. Elle parasite le sorgho, le riz, le millet, la canne à sucre et le haricot. Son développement est favorisé par les insectes. Ce champignon est thermotolérant (5 à 40°C), la température optimale de croissance étant de 25-30°C. Il se développe mal en atmosphère confinée ou modifiée (N₂ et/ou CO₂), au cœur des ensilages par exemple. Une croissance optimale nécessite une teneur en eau supérieure à 22 % et une activité hydrique supérieure à 0,9 [2].

Les voies de synthèse des fumonisines sont encore mal connues et la production de toxine n'est pas systématique. Les facteurs de variation sont nombreux : souche et espèce fongique, conditions de croissance (nature et teneur en eau du substrat, température, activité hydrique et confinement). La température optimale de production est de 20°C mais elle débute dès 4°C. La production de toxine est fortement défavorisée pendant le stockage, le séchage, l'ensilage ou la fermentation si ces derniers sont correctement réalisés [3, 4, 5, 6].

La structure plane de la fumonisine B1 a été élucidée en 1988 par résonance magnétique et spectrométrie de masse. C'est une longue chaîne primaire de 20 carbones hydroxylés contenant des groupes méthyles et un groupe amine primaire : le 2-amino-12,16-diméthyl-3,5,10,14,15-pentahydroxyeicosane. Les deux hydroxyles des carbones 14 et 15 sont estérifiés avec l'acide propane 1,2,3 tricarboxylique. Son poids moléculaire est de 722g/mol [7,8]. La structure de la fumonisine B1 est présentée sur la figure 1. Du fait de la présence de quatre groupes acides carboxyliques et de la fonction amine primaire, elle est soluble dans l'eau et encore plus dans le méthanol ou le mélange acétonitrile-eau. Elle est insoluble dans les solvants apolaires, ce qui explique sa découverte tardive, puisque l'isolation des mycotoxines est le plus souvent réalisée dans les phases liposolubles [9].



Fumonisine B1 : R1=R2=OH

Figure 1: Structure générale des fumonisines [7]

La clé du mécanisme d'action de la fumonisine B1 est sa structure, qui est très proche de celle de la sphingosine, constituant cellulaire des sphingolipides. Elle interfère avec leur métabolisme par inhibition de la N-acétyltransférase (ou céramide synthétase) [10, 11]. Les voies de biosynthèse des sphingolipides sont présentés sur la figure 2.

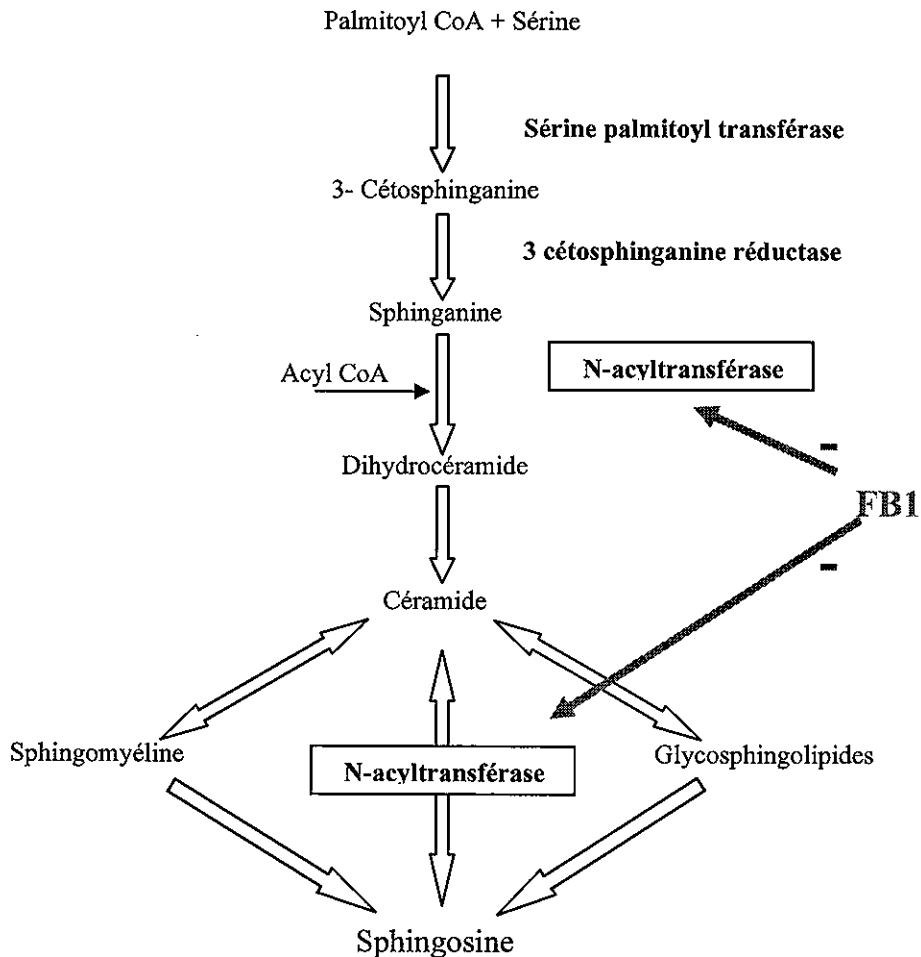


Figure 2: Voies de biosynthèse des sphingolipides

La conséquence de cette inhibition est la diminution de production de sphingosine et de céramides. Ces phospholipides ont des propriétés structurales et fonctionnelles. Ils participent en effet à la transcription de certains gènes et à la modulation de l'activation de

certaines protéines cellulaires. De ce fait, des fonctions biologiques telles que la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire ou l'apoptose sont altérées par l'action de la fumonisine B1, ce qui explique ses propriétés cytotoxiques et son pouvoir carcinogène [12, 13, 14].

Les différentes espèces animales sont plus ou moins sensibles aux effets de la fumonisine B1. Les équidés apparaissent comme l'espèce la plus sensible aux fumonisines. On répertorie trois types d'affections associées à la consommation de fumonisine dans cette espèce : la leucoencéphalomalacie, l'hépatotoxicose, et le syndrome duodénite/jéjunite proximale. La leucoencephalomalacie (LEM) est une maladie neurotoxique, non infectieuse, sporadique des chevaux, ânes, poneys et mules, d'évolution toujours mortelle, caractérisée à l'autopsie par l'apparition de zones de dégénérescence de la substance blanche cérébrale [15]. Elle a été décrite pour la première fois aux Etats-unis en 1902, depuis de nombreux cas ont été décrits dans le monde, y compris en France [16]. L'hépatotoxicose a longtemps été considérée comme une variante de la LEM, et il a été montré qu'une exposition longue à faible dose entraîne plutôt des lésions de type cérébrales et qu'une exposition courte à forte dose entraîne plutôt des lésions types hépatiques [17]. Il n'existe cependant pas de démarcation nette, et les deux types de lésions sont le plus souvent coexistantes. Le syndrome duodénite/ jéjunite proximale du cheval est une maladie de l'intestin grêle caractérisée par un important reflux gastrique, parfois hémorragique [18].

Les porcins sont également une espèce sensible aux fumonisines. La FB1 est responsable de l'oedème pulmonaire porcin, syndrome mis en évidence expérimentalement en 1981 à la suite d'observation sur le terrain. Elle est également responsable d'atteintes hépatiques sévères [19, 20, 21].

Les ruminants apparaissent comme beaucoup plus résistants aux effets toxiques de la fumonisine que les chevaux et les porcs [22], et cela principalement grâce au rôle détoxifiant du rumen.

Les volailles sont également peu sensibles. L'atteinte hépatique prédomine chez le poulet. Lors d'exposition à de fortes doses, elle s'accompagne de troubles de l'hémostase, d'une altération des protéines sériques et d'une diminution de la concentration des lipides hépatiques [23, 24]. Le canard présente également principalement une atteinte hépatique et des retards de croissance [25].

Chez les primates non-humains, la toxine serait responsable d'arrêts cardiaques ainsi que de problèmes d'athérosclérose [26].

Les propriétés carcinogénétiques de la FB1 ont été mis en évidence chez le rat, mais n'ont pas été démontrées chez d'autres espèces.

La FB1 a été mise en évidence sur du maïs et des produits élaborés à base de maïs en Afrique, Asie, USA, Canada, Afrique du Sud et en Europe. De fort taux ont été retrouvés sur du maïs destiné à l'alimentation humaine provenant d'Afrique du Sud (117mg/kg) et de Chine (150mg/kg), et associés à de fortes incidences de cancer de l'œsophage [27]. Dans ces régions, le maïs est la base de l'alimentation, d'autant plus que les épis de blé sont également utilisés pour la fabrication de bière. La présence de *Fusarium verticillioides* a d'abord été corrélée aux taux de cancer de l'oesophage. Avec le développement des techniques de quantification de la FB1, il a été montré que la quantité de fumonisine dans le maïs des régions à haut risque est significativement plus élevée que dans les régions à faible risque. Des observations très similaires ont été effectuées en Chine dans la province de Henan, où non seulement l'incidence de *Fusarium verticillioides* s'est révélée supérieure, mais des échantillons de maïs ont montré des taux de FB1 allant de 18 à 155mg/kg. Dans une étude comparant le taux de FB1 entre deux régions à haut et bas taux de cancer primaire du foie, il a été suggéré que la toxine pouvait jouer un rôle important dans la promotion de ces cancers, associée à d'autres facteurs tels que le virus de l'hépatite B [28]. La province de Pordenone, au nord de l'Italie a le plus fort taux de cancer de la cavité orale, du pharynx et de l'oesophage d'Europe. Avec l'alcool et le tabac, la fumonisine reste un facteur étiologique probable vu la forte consommation de maïs dans cette région (Polenta). De la toxine a été par ailleurs mise en évidence sur du maïs cultivé dans la région, et sur des échantillons de polenta [29].

L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer a classé les fumonisines dans le groupe 2B comme possible composé cancérogène pour l'homme [30]. En 2004, un rapport sur la législation des fumonisines dans les aliments a été publié dans le Journal Officiel. Il suggère que soit mis en place un accord international concernant la législation des fumonisines pour protéger la santé publique. Le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) propose un PMTDI (Provisional Maximal Tolerable Daily Intake) de 2 µg FB totales seules ou en mélange/kg de poids [31, 32].

La mise en évidence de résidus de fumonisines chez les animaux destinés à la consommation humaine est donc importante et plusieurs travaux sont effectués à ce sujet. Le but de notre étude est de doser la fumonisine B1 dans le foie, le rein et le muscle de canard après administration de différentes doses par voie orale. Pour cela, notre travail sera présenté en deux parties : mise au point d'une méthode d'extraction et de purification de la fumonisine B1 dans le foie, et validation de cette méthode afin de l'appliquer aux foies, reins, et muscles de canards. Chacune de ces parties sera précédée d'une introduction spécifique sur les méthodes de dosage de la FB1 et sur la toxicocinétique chez l'animal.

Partie I : Mise au point d'une méthode d'extraction et de purification de la FB1 dans le foie

1. INTRODUCTION : LES METHODES DE DOSAGE DE LA FB1

Les techniques de dosage de la fumonisine B1 ont été mises au point sur des matrices végétales puis adaptées aux matrices carnées. Elles sont fondées sur la solubilité et la polarité de la molécule. Les étapes de l'analyse sont l'extraction, la purification et la quantification.

La phase d'extraction a pour but de récupérer la fumonisine de la matrice. Les solutions d'extraction le plus souvent utilisées sont les mélanges acétonitrile (ACN)/eau ou méthanol/eau [33, 34]. Le pH est ajusté à l'aide de solutions tampons. Pour les échantillons solides, une phase de broyage et d'homogénéisation est nécessaire. Le mélange doit ensuite être centrifugé et filtré avant le passage à l'étape de purification [35].

L'étape de purification a pour but de retirer les impuretés de l'échantillon et de concentrer la fumonisine. La purification peut-être réalisée par l'utilisation de colonnes C18, échangeuses d'ions (SAX) ou d'immunoaffinité. L'utilisation de colonnes SAX permet la meilleure purification de la FB1 à partir du maïs [36]. Cependant, leur utilisation nécessite un ajustement précis du pH (autour de 5,8) et un contrôle rigoureux du débit (autours de 1mL/min) [37]. La purification effectuée par colonnes C18 est plus aléatoire. Cette technique est améliorée lorsqu'elle est couplée avec l'utilisation de colonnes SAX [38]. L'utilisation de colonnes à immunoaffinité permet une purification plus sélective. Cependant, la capacité de ces colonnes est limitée et l'échantillon doit être le plus souvent dilué [39].

La quantification de la FB1 repose sur différentes techniques chromatographiques : chromatographie sur couche mince (CCM), en phase gazeuse (GC) ou liquide (CL ou HPLC). Il existe également des techniques d'électrophorèse capillaire et ELISA. Ces techniques sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1: Techniques de dosages de la fumonisine B1 [40]

Méthode	Matrice	Purification	Marquage	LD
CCM	Maïs	SAX	Fluorescamine, vaniline, P-anysaldéhyde, ninhydrine	0,25 µg/mL
CG-SM	Maïs	SAX		0,5 µg/g
HPLC/Fluorométrie	Maïs	SAX	OPA FMOC, NBDF	0,01-0,05 µg/g 0,1µg/g
		C18	Fluorescamine	1 µg/g
	Lait	SAX	NDA	0,005 µg/mL
	Plasma		OPA	0,05 µg/mL
	Urines		OPA	0,008 µg/mL
	Fecès	C18	OPA	0,4 µg/g
	Maïs	Immunoaffinité	OPA	0,003 à 1,05 µg/g
HPLC/SM	Maïs	SAX		0,005 µg/g
EC	Maïs	Immunoaffinité	Fluorescéine	0,05 µg/g
EC	Aliments	C18	FMOC	0,5 µg/g
ELISA	Bière			0,003 µg/mL
	Lait			0,25 µg/mL
	Tissus			0,1 µg/mL

LD : Limite de Détection, CCM : Chromatographie sur Couche Mince, SAX : Strong Anion Exchange, SM : Spectrométrie de Masse, HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression, OPA : O-Phtalyldialdéhyde, FMOC : 9-fluorenylméthyl-chloroformate, NBDF : 4-fluoro-7-Nitrobenzofurazan, NDA : Naphtalène-2,3-dicarboxyaldéhyde, EC : Electrophorèse Capillaire, ELISA : Enzyme Liked Immuno Assay.

La technique la plus ancienne est la chromatographie sur couche mince. Cette méthode est rapide et peut être automatisée. Elle n'est cependant pas très sensible et ne permet pas la détection de faibles concentrations. La phase fixe est un gel de silice ou une phase greffée C18. La migration est permise par une phase liquide constituée respectivement d'un mélange chloroforme-eau-acide acétique (6/3/1) ou méthanol-KCl aqueux 4% (3/2). La détection est réalisée après vaporisation de p-anisaldéhyde ou de ninhydrine pour les gels de silice ; elle est réalisée après vaporisation de tampon borate puis fluorescamine puis acide borique pour les phases greffées C18. Les plaques sont séchées puis examinées sous lampes UV [38, 40, 41].

La chromatographie gazeuse utilise l'azote ou l'argon comme phase gazeuse. Elle nécessite une étape d'hydrolyse : soit une hydrolyse acide libérant l'acide propane-tricarboxylique qui est ensuite méthylié pour le rendre volatil, soit une hydrolyse basique libérant l'aminopolyol. Les limites de détection obtenues par cette méthode sont supérieures à celles de la chromatographie sur couche mince mais la quantification peut être biaisée. En

effet, le champignon peut produire d'autres composés conduisant au même acide [38].

L'électrophorèse capillaire permet une quantification de la FB1 en utilisant un minimum de solvants organiques, mais la séparation des FB1 et FB2 est mauvaise [40].

Les techniques ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) sont très utilisées sur la matrice maïs et présentent une certaine rapidité d'utilisation. La sensibilité de ces techniques est bonne mais la spécificité peu intéressante ; en effet des réactions croisées peuvent exister entre la FB1, la FB2 et la FB3 [40].

L'HPLC est la technique de séparation de référence utilisée par 90 % des laboratoires [35]. Elle a été développée par Shephard et al. en 1990 et améliorée par Sydenham et al. en 1992. La purification s'effectue sur une colonne en phase inverse. L'éluant le plus utilisé est le mélange méthanol-phosphate de potassium. En effet, les phases mobiles acétonitrile-phosphate de potassium donnent de moins bons résultats. Le pH de la phase mobile doit se situer aux alentours de 3,5 pour obtenir une bonne séparation des pics [38, 42, 43].

La fluorométrie est le mode de détection le plus utilisé. La fumonisine n'absorbant ni dans le visible, ni dans l'ultra-violet, une dérivatisation est indispensable. Différents réactifs de dérivatisation peuvent être utilisés. Le 9-fluorénylméthylchloroformate et la fluorescamine ne permettent pas de dérivatisation efficace car ils mènent à l'obtention de deux pics au lieu d'un seul. Le 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan présente des limites de stabilité. Le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde nécessite l'utilisation de cyanure de potassium qui est toxique. L'o-phthaldialdéhyde, bien qu'il soit instable, est donc le réactif de choix. La dérivatisation est reproductible à température ambiante à un pH compris entre 9 et 10. Le délai avant l'injection dans l'analyseur ne doit pas excéder 4 minute, temps au delà duquel se forme des dérivés [38, 39, 43, 44].

L'association de la spectrométrie de masse à l'HPLC permet de s'affranchir de la dérivatisation. Cette technique est plus sensible que la précédente mais les résultats sont très disparates et parfois aberrants [38].

La technique de quantification utilisée dans notre laboratoire a été validée au cours d'études antérieures [40, 45, 46]. Elle utilise l'HPLC couplée à la détection par fluorométrie avec dérivatisation pré-colonne par l'o-phthaldialdéhyde. La validation de cette méthode est présentée sur le tableau 2.

Tableau 2: Critères statistiques de validation de la méthode de dosage [40, 45, 46]

Linéarité	Linéarité	0,01-1 µg/mL
	R ²	0,9999
	CV% du FR	8,55
Limites de détections et de quantification	LD	0,0015 µg/mL
	LQ	0,0375 µg/mL
Précision	Répétabilité ([FB1] : 0.5 µg/mL, n = 15)	CV% de l'aire = 3,27
	Reproductibilité ([FB1] : 1 µg/mL, n = 3 essais/j)	CV% du FR = 4,79

Les études effectuées antérieurement dans notre laboratoire ont permis de finaliser la méthode d'extraction et de purification de la FB1 à partir du plasma [45, 46]. Cette méthode utilise une extraction à l'acétonitrile et une purification par passage sur colonnes SAX. Dans le cas des plasmas de canards maigres, la limite de détection a été estimée à 0,04 µg/mL, le pourcentage d'extraction moyen de la FB1 est de 67 %.

Le foie étant une matrice complexe, une méthode de dosage doit être mise au point. Des essais ont été préalablement réalisés dans lesquels l'extraction et la purification de la FB1 dans le foie sont réalisées sans colonnes [45]. Le pourcentage d'extraction obtenu est de 56%. Cependant, les tracés chromatographiques sont parfois difficiles à interpréter. De plus, cette méthode conduit à un encrassement de la colonne du chromatographe.

Notre travail expérimental a donc débuté par la détermination de la meilleure méthode d'extraction et de purification de la fumonisine à partir du foie. Différents procédés ont été comparés, en utilisant des foies de canard témoins et des foies supplémentés en FB1 à 1µg/g.

La méthode qui sera jugée la plus performante, c'est-à-dire qui permettra d'obtenir le meilleur pourcentage d'extraction et les chromatogrammes les plus interprétables, sera ensuite validée en vu de son utilisation pour le traitement des échantillons de tissu obtenus après administration orale de FB1 à des canards.

2. MATERIELS ET METHODES

2-1. Matériels

2-1-1. Consommables

Les consommables utilisés sont des micropipettes et des cônes P10, P100 et P1000 Eppendorf (Hambourg, Allemagne), des tubes en plastique de 15ml Falcon (Elancourt, France), des seringues de 1ml Codan (Allemagne), des aiguilles Néolus 0,6mm Terumo (Belgique), et des filtres à seringue de 4mm avec une membrane de 0,45µm Gelmon Laboratory (USA).

Les colonnes d'extraction utilisées sont de deux types : colonnes échangeuses d'ions SAX 500mg Bond Elut (Harbor City, USA) et des colonnes d'immuno-affinité Fumoniprep de R-Biopharm (France).

2-1-2. Standard

Le standard de FB1 ayant servi à la partie analytique et à la mise au point de la méthode a été fourni par Biopure (Tullin, Austria), en solution dans un mélange ACN/eau (1/1), à la concentration de 51,1µg/mL, ce standard étant certifié en terme de concentration. Des gammes étalon de solutions standards de 0,006 à 2,5µg/ml ont été réalisées en utilisant le même solvant. Ces solutions se conservent 6 mois à 4°C à l'abri de la lumière.

La Fumonisine B1 utilisée pour l'administration aux animaux a été produite et purifiée à l'ENVT (Ecole National Vétérinaire de Toulouse) par l'équipe de mycologie.

2-1-3. Système HPLC

Une pompe M2200 (Bischoff, Leonberg, Allemagne) est reliée à une colonne ProntoSIL C18 (Bischoff Chromatography, Leonberg, Allemagne) de porosité 5µm et de taille 250 x 4,6mm. La pré-colonne, de même nature que la colonne, provient du même fournisseur. La sortie de colonne est connectée à un détecteur de fluorescence programmable RF 10A XL (Shimadzu, Kyoto, Japon) ainsi qu'à un système d'acquisition de données PIC3 (ICS, Toulouse, France). La dérivation et l'injection de l'extrait se font grâce à un préparateur/passeur d'échantillons 718 AL Alcott (Norcross, USA).

2-1-4. Solvants et réactifs

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH), l'eau distillée et l'acide acétique glacial, de qualité HPLC sont fournis par Scharlau (Barcelone, Espagne). Les autres produits chimiques (Acide borique, borate de sodium, β -mercaptoéthanol, o-phthaldialdéhyde) proviennent de Sigma (Saint-Louis, USA). Le dihydrogénate de sodium et l'acide orthophosphorique 85% sont fournis par Fluka (Buchs, Allemagne). L'acide chlorhydrique fumant 37% est produit par Merck (Darmstadt, Allemagne). Les tensioactifs (polyéthylèneglycol, solvesso et tween) proviennent de l'ENVT.

2-1-5. Préparation des solutions

Le tampon borate pH 5,8 utilisé pour l'extraction est constitué de 100mL d'acide borique 0,1M ajusté par une solution de borate de sodium 0,1M. Ce pH permet d'obtenir la FB1 contenue dans l'échantillon sous forme anionique avant passage sur colonne SAX, et d'optimiser la rétention du composé sur ce type de colonne [38].

Le tampon borate pH 8,5 utilisé pour la réaction de dérivation est composé de 45mL d'acide borique 0,1mol/L (618mg d'acide borique dans 100mL d'eau) et 5mL de borate de Na 0,1mol/L (3,8g de téborate de sodium dans 100mL d'eau). Ce pH correspond au pH optimum de dérivation de la FB1 par l'OPA [43].

Le tampon PBS utilisé pour le lavage durant l'extraction est obtenu par dissolution d'une pastille fournie par R-biopharm (France) dans 100mL d'eau distillée.

Le réactif de dérivation est obtenu par mélange de 5mg d'OPA, de 2,5mL d'ACN et de 5 μ L de β Meraptoéthanol. Cette solution doit être stockée à l'abri de la lumière et peut-être conservée 4 jours à température ambiante [34, 37]. L'OPA réagit avec la fonction amine primaire de la FB1 selon la réaction décrite sur la figure 3.

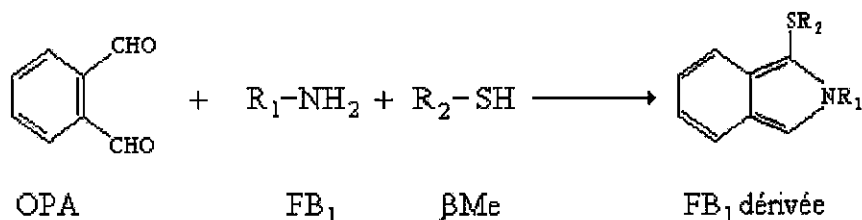


Figure 3: Schéma de la réaction de dérivation [2]

La phase mobile du système HPLC est constituée de méthanol/tampon phosphate pH 3,35 (75/25), puis filtrée grâce à une fiole à vide de 1L Millipore (Allemagne) et des filtres nylon 0,2 μ m Sun-sri (USA).

Le tampon phosphate est préparé à la concentration de 0,1mol/L dans l'eau et le pH ajusté à 3,35 par de l'acide orthophosphorique. En effet, le pH doit être maintenu en dessous de 3,5 pour obtenir des pics biens distincts [43].

2-1-6. Appareillage

L'agitation est réalisée avec une table d'agitation horizontale HS 501 IKA Labortechnik (Allemagne). La mise en suspension est permise grâce à un vortex IKA Labortechnik, et un sonicateur Branson (Toulouse France). La centrifugation s'effectue grâce à une centrifugeuse GR 200 SX Jouan (France). L'évaporation est réalisée sous hotte classe B Astec (Alfortville France), sous courant d'air créé par une pompe MFG Corp (USA). Pour les pesées des échantillons, une balance de précision AJ 100 classe Mettler (Viroflay, France) est utilisée, et une balance Sartorius BP 2100 (Toledo, Espagne) pour la préparation des solutions tampons. Le pH-mètre 522 utilisé vient de Technalab (Toulouse, France) et l'agitateur magnétique Rotomag 10 vient de Prolabo (France).

2-2. Extraction et purification de la FB1 dans le foie

Après décongélation à température ambiante ou à l'étuve 37°C, des aliquots de tissus de 1g sont pesés à la balance de précision.

Pour chacune des étapes ayant permis la mise au point de la méthode, les échantillons ont été supplémentés de la même manière : 20µL de solution standard à 51,1µg/mL sont ajoutés à 1g de foie, ce qui équivaut à une concentration de 1µg/g. Cette concentration ayant également été utilisée pour la validation de la méthode, le 100% théorique est ainsi bien connu.

L'analyse de la FB1 par HPLC avec dérivation pré-colonne, nécessite une étape d'extraction et de purification afin de séparer les impuretés et de concentrer la toxine [38]. Après le broyage, cela commence par une étape d'extraction en phase liquide : le caractère polaire de la molécule la rend particulièrement soluble dans le méthanol et l'acétonitrile. Puis s'en suit une purification sur colonnes: colonnes échangeuses d'ions ou colonne à immunoaffinité.

2-2-1. Extraction et purification par colonnes SAX

La synthèse des étapes de mise au point de la méthode d'extraction et de purification sur le foie avec colonne SAX est présentée sur la figure 4.

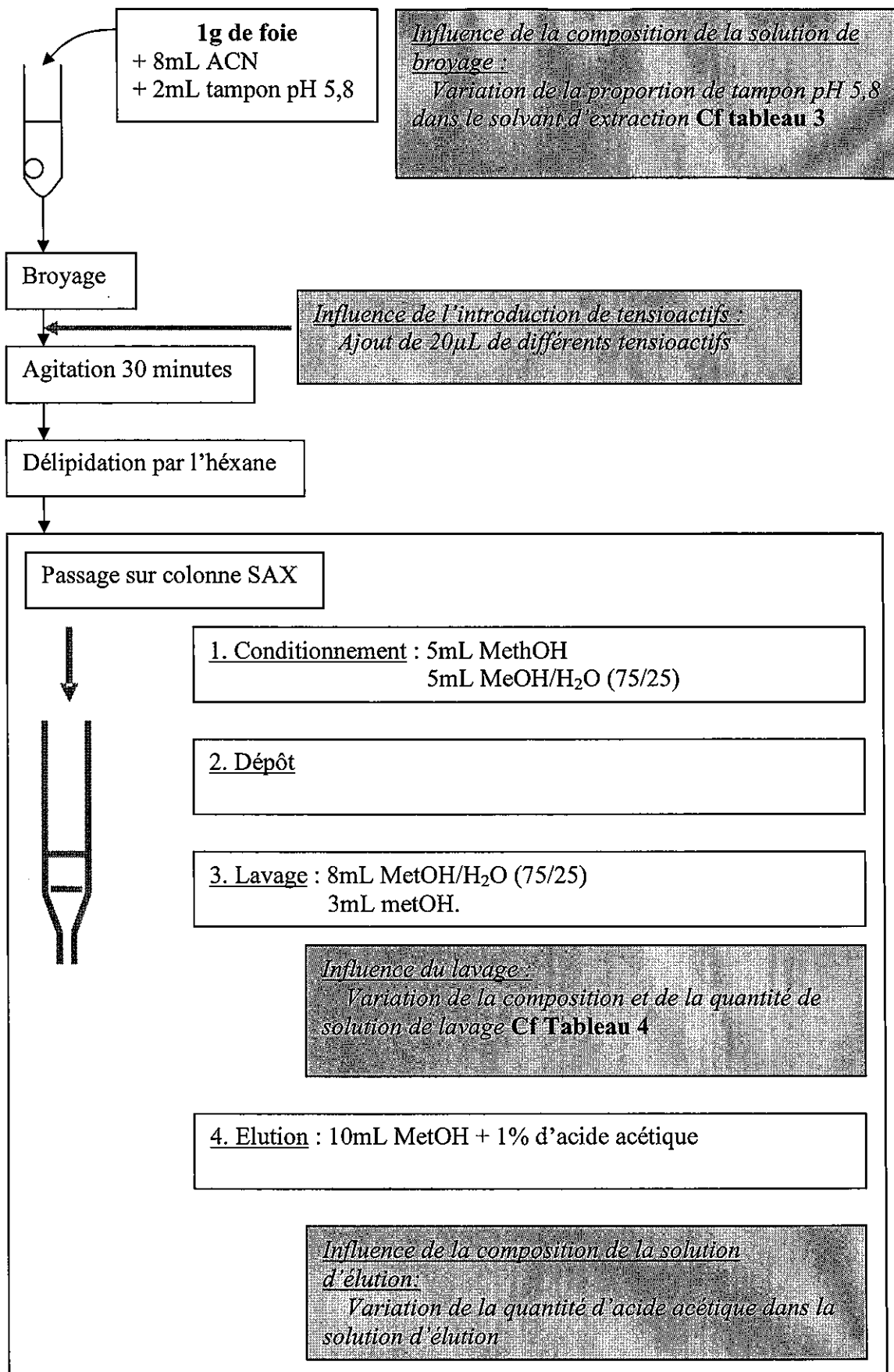


Figure 4 : Mise au point d'une méthode d'extraction et de purification avec colonnes échangeuses d'ions

A. Application de la méthode mise au point sur le plasma au foie

La méthode utilisée en première intention a été celle mise au point pour doser la fumonisine dans le plasma au cours d'études précédentes [46].

- Environ 1g de foie est broyé au Potter téflon à 500tours/min dans 8mL d'acétonitrile et 2mL de tampon borate pH 5,8, puis supplémenté avec 20µL du standard de FB1 à 51,1µg/mL. Le mélange obtenu est agité sur une table d'agitation à 300mvt/min pendant 30 minutes puis centrifugé pendant 15 minutes à 4000rpm.

- 2mL de surnageant sont récupérés. Ils sont tout d'abord délipidés par ajout de 2mL d'hexane et passage 1 minute au vortex. L'élimination de l'hexane s'effectue après centrifugation 5 minutes à 4000g. Cette opération est réalisée deux fois de suite.

- La phase aqueuse est récupérée et passée sur colonne SAX sous vide à débit de 1mL/min. Ce débit permet d'obtenir des résultats reproductibles [37, 38]. Le conditionnement est préalablement réalisé avec 5mL de Méthanol, puis 5mL de MeOH/H₂O (75/25). A partir de ce moment, la colonne ne doit plus être séchée. Une fois l'échantillon passé, la colonne est lavée avec 8mL de MeOH/H₂O (75/25) et 3mL de méthanol. L'élution est faite avec 10mL MeOH + 1 % d'acide acétique.

- Pour la mise au point de la méthode, chacune des phases passées sur la colonne (dépôt, lave et éluions) est récupérée et évaporée à sec à une température comprise entre 55°C et 65°C.

- Le résidu sec est ensuite récupéré dans 200µl de mélange eau/acétonitrile (1/1) avant d'être dérivatisé.

Comme il sera expliqué ultérieurement, les résultats obtenus n'étant pas aussi satisfaisants que ceux obtenus sur le plasma, il a été envisagé de faire varier certains paramètres afin d'améliorer cette méthode d'extraction pour le traitement d'échantillons hépatiques.

B. Influence de la composition de la solution de broyage

En utilisant des colonnes échangeuses d'ion, l'ionisation de la molécule est très importante, puisque c'est la forme anionique de l'acide carboxylique qui va se lier aux contres ions de la colonne. Compte tenu du caractère acide de la FB1, le pH du soluté doit être compris entre 5,8 et 6,5 afin qu'elle soit ionisée [38]. Il a été considéré que la matrice foie pouvait interférer avec le pH. Nous avons donc fait varier la proportion de tampon 5,8 utilisée lors du broyage de l'échantillon selon les modalités présentées dans le tableau 3. Le broyage, la délipidation et le passage sur colonne sont inchangés.

Tableau 3: Variations de composition de la solution de broyage (colonnes SAX)

Tampon 5,8 (mL)	2	3	4	5
MetOH (mL)	4	3	2	1

C. Influence du lavage

Dans cette étude, nous avons exploré l'importance du lavage de la colonne, à la fois en terme de quantité et en terme de pH. Ces travaux ont été effectués en utilisant une solution de broyage constituée d'un mélange tampon 5,8/MetOH (4/2). Le lavage de la colonne SAX est effectué avec différentes quantités de mélange tampon 5,8/MetOH (1/3) et de tampon 8,5/MetOH (1/3) comme décrit dans le tableau 4. Le reste de la manipulation est inchangée.

Tableau 4: Variations de quantité et de composition de la solution de lavage (colonnes SAX)

Solution de lavage	Volume (mL)								
Tp 5,8 +MetOH (1/3)	8	6	4	2					
Tp 8,5 +MetOH (1/3)					5	4	3	1	

D. Influence de la composition de la solution d'éluion

La méthode utilisée pour le dosage de la FB1 sur le plasma est reprise sans modifications pour toutes les manipulations pré colonne, ainsi que pour le conditionnement, le dépôt et le lavage de la colonne. Cependant, deux concentrations d'acide acétique dans la solution d'éluion ont été testées : 1% et 5%, en gardant un même volume de 10mL.

E. Influence de l'introduction de tensioactifs

La structure de la fumonisine B1 se rapprochant de celle d'un lipide, et la complexité de la composition de la matrice foie, notamment sa richesse en lipoprotéines, font penser que des micelles peuvent se former lors de la mise en solution en phase aqueuse et gêner l'extraction de la toxine. Différents tensioactifs ont donc été utilisés : le tween, le polyéthylenglycol (PEG) et le solvesso afin de détruire ces éventuelles micelles. 20µl de ces tensioactifs ont été ajoutés entre le broyage et l'agitation, le reste de la méthode restant inchangée. Un échantillon témoin est traité sans tensioactif.

2-2-2. Extraction et purification par colonnes d'immunoaffinité

Les colonnes d'immunoaffinité contiennent des anticorps monoclonaux hautement spécifiques des fumonisines B1, B2 et B3. Lors du passage sur la colonne, la FB1 est liée aux anticorps. Le lavage permet ensuite d'éliminer de la colonne les substances indésirables et

non liées aux anticorps. L'élution détache ensuite la toxine, et peut-être réalisée soit avec de l'acétonitrile, soit avec du méthanol.

La synthèse des étapes de mise au point de la méthode d'extraction et de purification sur le foie avec colonnes d'immunoaffinité est présentée sur la figure 5.

A. Essai de 4 méthodes d'extraction

Quatre méthodes d'extraction ont été testées. Chacune d'elle est précédée d'une étape commune dans laquelle 1g de foie est broyé dans un mélange constitué de 4mL d'eau, 2mL de méthanol et 2mL d'acétonitrile, auxquels sont ajoutés 20µl de standard de FB1 à 51,1µg/mL.

- Dans la méthode d'extraction 1 décrite par le fabricant sur du maïs ainsi que sur de la nourriture sur enfant («**Procédure d'extraction sans agitation**»), 0,025g de NaCl sont ajoutés à 2mL de broyât, le tout étant ensuite homogénéisé, puis centrifugé 15min à 5000rpm. Le surnageant est repris dans 8mL de tampon PBS, puis déposé sur la colonne.

- Dans la méthode d'extraction 2 décrite par le fabricant sur du maïs («**Procédure d'extraction par agitation 2x20 minutes**»), 2mL de broyât sont agités 20min à la table à agitation à 300mvt/min, puis centrifugés 15min à 5000rpm. Le surnageant est mis de côté, alors que le culot est extrait une seconde fois avec 2mL de mélange Eau/ACN/MetOH (50/25/25) et agité de nouveau 20 minutes. Après une seconde centrifugation le surnageant est récupéré, ajouté au précédent et à 6mL de tampon PBS.

- Dans la méthode d'extraction 3 décrite par le fabricant sur du maïs («**Procédure d'extraction par agitation de 2 heures**»), 2mL de broyât sont agités 2h, puis centrifugés 15 minutes à 5000rpm et ajoutés à 8mL de tampon PBS.

- La méthode d'extraction 4 est dérivée de la méthode 1 : une étape de délipidation à l'hexane est réalisée avant le passage sur la colonne. Elle est réalisée de la même manière que celle décrit précédemment pour l'extraction utilisant des colonnes échangeuses d'ions.

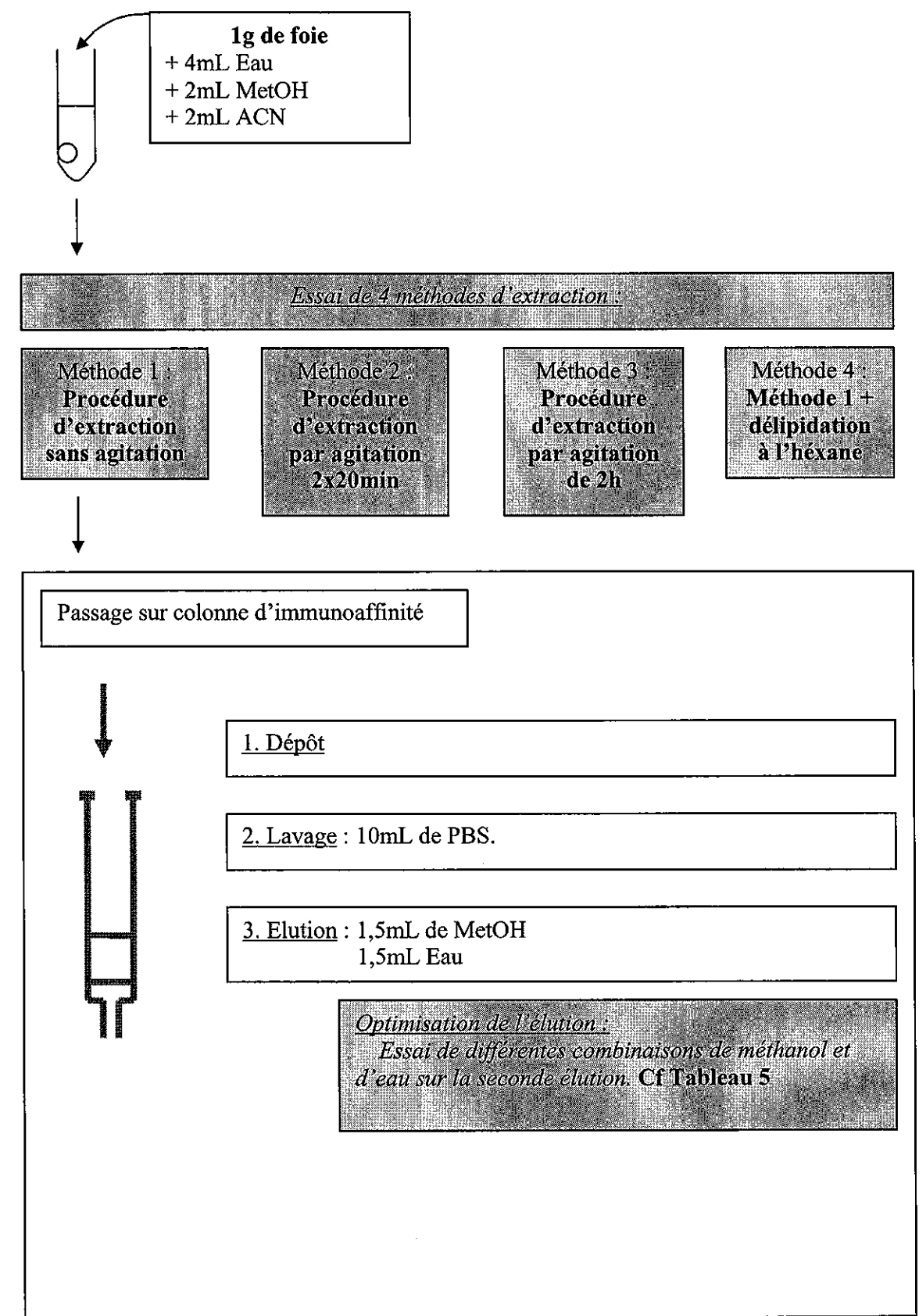


Figure 5: Mise au point d'une méthode d'extraction et de purification avec colonne d'immunoaffinité

Les colonnes d'immunoaffinité sont stockées entre 2 et 8°C et elles sont sorties à température ambiante 30 minutes avant la manipulation. Le dépôt de l'échantillon de 10mL se fait dans un réservoir en verre fixé sur le haut de la colonne, et le passage se fait par gravité ou bien en utilisant une pompe à main constituée d'une seringue de 20mL et d'un joint en caoutchouc ; le débit est alors maintenu entre 1 et 2mL/min. Le lavage de la colonne est réalisé avec 10mL de tampon PBS, dans les mêmes conditions que précédemment. La colonne est ensuite séchée en passant de l'air à travers grâce à la pompe à main. L'élution est réalisée avec 1,5mL de méthanol, puis 1,5mL d'eau, introduits successivement, directement dans la colonne après retrait du réservoir en verre ; le débit de passage se fait par pesanteur. Enfin, la colonne est séchée à la fin de l'élution afin de récupérer la totalité de l'éluât. Les 3mL d'éluât sont évaporés sous courant d'air, chauffé à 55°C. L'extrait sec est remis en solution dans 200µL d'ACN/eau (1/1), passé au vortex et au sonicateur 5min. 50µL de cette solution sont placés sur le préparateur/passeur d'échantillon du système HPLC. En cas de délai entre la préparation et l'analyse, le résidu sec est conservé à 4°C à l'abri de la lumière, et repris le lendemain dans 200µL de mélange ACN/Eau (1/1).

B. Optimisation de l'élution

Différentes méthodes de lavage des colonnes d'immunoaffinité ont été explorées afin d'améliorer le pourcentage d'extraction. De plus, il était intéressant de savoir s'il ne restait pas de la FB1 dans les colonnes pour pouvoir les réutiliser ultérieurement.

La méthode pré-colonne n'a pas été modifiée, ni le dépôt ou le lavage de la colonne. La composition de la première élution est maintenue constante à 1,5mL de méthanol, puis 1,5mL d'eau. Pour la seconde élution, différentes combinaisons ont été utilisées telles que décrites dans le tableau 5.

Tableau 5: Variation de la composition de la solution d'élution (colonnes d'immunoaffinité)

Elution 1 (mL)	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau
Elution 2 (mL)	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau 1,5 Met	1,5 Met 1,5 Eau 1,5 Met 1,5 Met	1,5 Met 1,5 Eau 1,5 Met 1,5 Eau

2-3. Dosage et quantification

Dérivatisation :

Cette dérivatisation pré colonne se fait par mélange de 50 μ L d'extrait purifié, 50 μ L d'eau, 50 μ L de tampon borate pH 8,5 et 50 μ L de solution d'OPA à température ambiante.

Il faut se conformer à un temps reproductible (1 minute dans notre cas) entre le moment de l'ajout de l'OPA et celui de l'injection à cause de la dégradation progressive des dérivés qui se produit après des périodes supérieures à 4 minutes [44]. De plus, le temps de 1 minute donne les résultats les plus reproductibles [49].

Séparation :

Après 1 minute à température ambiante 50 μ L d'extrait dérivatisé sont injectés dans la colonne prontosil C18. Le débit est contrôlé à 1mL/min, la phase mobile étant constituée de 75% de méthanol et 25% de tampon phosphate au pH 3,35.

Détection :

La détection de la fluorescence se fait pour les deux longueurs d'onde suivantes : λ excitation à 335nm et λ émission à 440nm.

Quantification :

La FB1 a été quantifiée dans les échantillons par mesure de l'aire du pic et report de cette aire sur la courbe d'étalonnage.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3-1. Extraction et purification par colonnes SAX

L'utilisation de colonnes SAX (Strong Anion Exchange) est le procédé le plus utilisé pour doser la FB1 dans le maïs. Ces colonnes présentent un niveau de purification supérieur aux colonnes C18 et aux procédés de purification sans colonne [35].

3-1-1. Application de la méthode mise au point sur le plasma au foie

La méthode utilisant des colonnes SAX mise au point sur le plasma a été appliquée au broyat d'un gramme de foie. Après séparation HPLC, on constate qu'aucun pic de FB1 n'est détectable sur le chromatogramme. En revanche, l'échantillon d'acétonitrile/eau, supplémenté et traité de la même manière que le foie, fournit un pic de FB1 de surface comparable à celle

d'un standard de concentration équivalente. Nous en concluons donc que la FB1 n'a pas pu être extraite du foie lors de la purification par la colonne. Cela n'était pas le cas avec le plasma, puisque le pourcentage d'extraction de la FB1 sur cette matrice est de l'ordre de 70% [46]. Deux mécanismes peuvent expliquer ce résultat : soit la toxine n'est pas retenue par la colonne, soit elle n'est pas correctement éluée. Afin de déterminer à quel niveau se situe le problème, nous avons décidé de faire varier la composition de la solution de broyage, la quantité et la composition de la solution de lavage, et enfin la composition de la solution d'éluion.

3-1-2. Influence de la composition de la solution de broyage

La solution de broyage utilisée dans la méthode mise au point sur le plasma était constituée d'un mélange tampon 5,8/ACN (1/4). Nous avons décidé de tester l'utilisation d'un mélange tampon 5,8/MetOH en proportions variables. Tous les liquides ayant traversé la colonne ont été récupérés à toutes les étapes (dépôt, lavage, éluion 1 et 2) afin de savoir à quels niveaux se situaient les pertes. Les résultats sont présentés sur le tableau 6.

Tableau 6: Influence de la composition du solvant d'extraction (colonnes SAX)

Composition du tampon de broyage (mL)	Tampon 5,8	2	3	4	5
	MetOH	4	3	2	1
Surfaces	Dépôt	3 527 151	1 152 965	ND	ND
	Lavage	2 140 001	1 504 704	839 300	2 816 649
	Elution 1 et 2 *	820 656	828 390	1 295 635	700 655
Surfaces	Récupération	820 656	828 390	1 295 635	700 655
	Pertes	5 667 152	2 657 669	839 300	2 816 649
	Retenu colonne **	0	2 846 148	4 197 272	2 814 903

ND : Pic de fumonisine non détectable.

* : Somme des deux éluions de 10mL chacun (aucune détection dans l'éluion 1).

** : Quantités théoriques obtenues par calculs : Surface standard non purifiée par colonne (6332207) = pertes (dépôt + lavage) + récupération (éluion 1 et 2) + retenu par la colonne.

On constate que lorsque la proportion de tampon 5,8 au cours du broyage est inférieure ou égale à 50%, la toxine n'est pas retenue par la colonne (elle est majoritairement retrouvée lors du dépôt). En augmentant la proportion de tampon (60 à 80%), la toxine se fixe mieux à la colonne mais est perdue au cours du lavage et/ou reste retenue dans la colonne.

Le pH de la solution d'extraction doit être maintenu autour de 5,8. Dans le cas contraire, l'acide carboxylique ionisé de la FB1 ne peut se fixer aux contre ions de la colonne et elle n'est plus retenue [37, 43]. Il est donc possible que le foie modifie le pH de la solution

d'extraction. Il aurait été intéressant de mesurer le pH des échantillons avant le passage sur la colonne. De plus, il est possible que certaines proportions de méthanol explorées dans le tableau 5 soient trop faibles par rapport à celles du tampon et que l'extraction ne soit pas correctement réalisée. Il aurait été intéressant de modifier la molarité du tampon, sans modifier la quantité de méthanol. Enfin, nous avons utilisé du méthanol et bien que la toxine soit aussi soluble dans l'acétonitrile que dans le méthanol, il a été décrit sur du maïs que le mélange ACN/eau permettait une extraction la plus efficace et plus rapide [43].

Quoiqu'il en soit, la solution de broyage nous ayant donné les meilleurs résultats est constituée du mélange tampon 5,8/MetOH (4/2). Nous avons donc choisi de garder cette proportion afin d'étudier l'influence du lavage. En effet, les résultats obtenus avec ce mélange montrent que de la toxine est perdue au cours de cette étape. Deux hypothèses sont envisageables : soit le volume de solution de lavage utilisé est trop abondant, soit son pH n'est pas adapté car une acidité trop importante peut conduire à une élution trop précoce.

3-1-3. Influence du lavage

Dans la méthode mise au point sur le plasma, le lavage était effectué avec 8mL de méthanol puis 3mL de mélange MetOH/eau (3/1). Nous avons décidé de modifier la composition de cette solution en utilisant un mélange tampon 5,8/MetOH (1/3) ainsi que tampon 8,5/MetOH (1/3). Nous avons également fait varier le volume de solution utilisée. Ces résultats sont présentés dans le tableau 7.

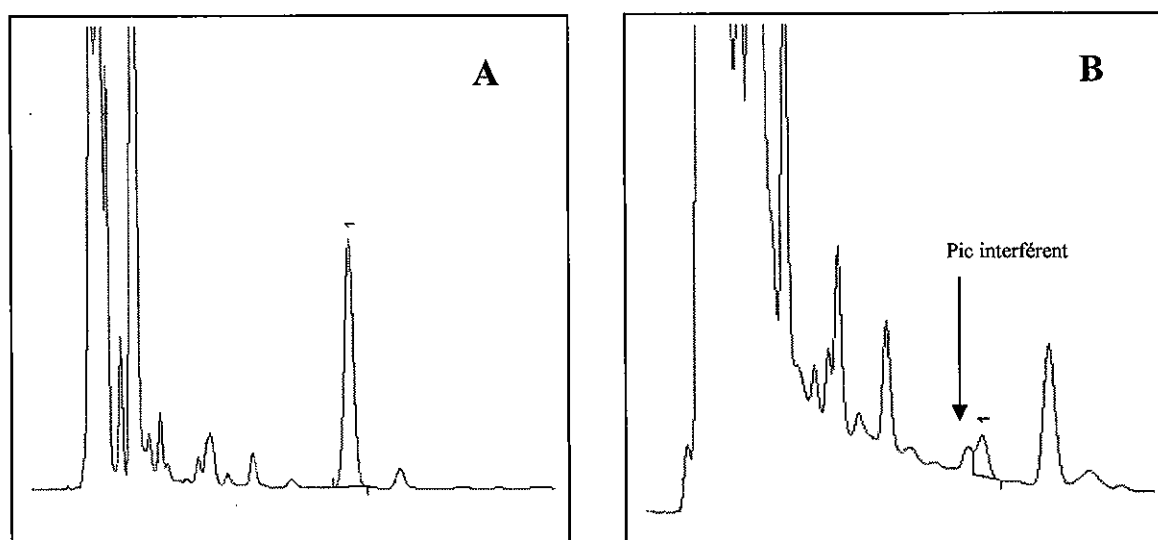
Tableau 7: Influence de la composition et du volume de solution de lavage (colonnes SAX)

Solution de lavage (mL)	Tp 5,8/ MetOH	8	6	4	2				
	Tp 8,5/ MetOH					5	4	3	1
Surfaces	Elution 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Elution 2	ND	ND	ND	ND	1715472	2198483	2486160	1370396
	Elution 3	NQ	2040640	1506775	NQ	ND	ND	ND	1244545
% Extraction élution1+2+3		NQ	32	37	NQ	27	38	40	41

ND : Pic de fumonisine non détectable.

NQ : Pic de fumonisine non quantifiable , chromatogrammes non interprétables

On constate que pour des quantités de solutions tampon 5,8/MetOH (1/3) de l'ordre de 4 à 6mL, les variations des aires sont négligeables. L'utilisation de tampon 8,5 n'améliore pas le pourcentage d'extraction (30 à 40%) quelque soit le volume utilisé. De plus, lorsque le lavage n'est pas assez important, les profils chromatographiques sont complexes et certains chromatogrammes n'ont pas pu être interprétés à cause de trop nombreux pics interférents. La comparaison du chromatogramme d'un standard non traité et du chromatogramme d'un échantillon dont le lavage a été réalisé avec 2mL de mélange tampon 5,8/MetOH (1/3) est présentée sur la figure 6.



1 : Pic de fumonisine B1

Figure 6: Comparaison du chromatogramme d'un standard non traité (A) et du chromatogramme d'un échantillon dont le lavage a été réalisé avec 2mL de mélange tampon 5,8/MetOH (1/3) (B)

Ainsi, les résultats obtenus en faisant varier les conditions de lavage montrent que la modification du pH n'améliore pas le pourcentage d'extraction. De plus, le volume de solution de lavage utilisé ne doit pas être trop faible sans quoi les chromatogrammes ne sont plus interprétables. Nous en avons donc conclu qu'il fallait maintenir un lavage abondant (8 à 10mL) et que la perte de fumonisine au cours de cette étape était due à une mauvaise fixation à la colonne lors du dépôt.

Dans chacune des manipulations réalisées jusqu'ici (tableau 6 et 7), le composé n'est pas élué au cours de la première élution, ce qui est en contradiction avec ce qui est décrit dans la méthode AFNOR. De plus, une partie de la fumonisine est retenue par les colonnes après l'élution (tableau 6). Il était donc intéressant d'étudier la composition de la solution d'élution, puisque c'est l'acidification de la colonne qui permet de décrocher la fumonisine.

3-1-4. Influence de la composition de la solution d'élution

La méthode AFNOR recommande l'utilisation d'une solution d'élution composée de méthanol à 1% d'acide acétique. Afin d'optimiser la première élution, nous avons comparé son utilisation avec une solution à 5% d'acide acétique. Les résultats sont présentés sur le tableau 8.

Tableau 8: Influence de la composition de la solution d'élution (colonnes SAX)

Acide acétique dans le solvant d'élution (%)		1	5
Surfaces	Elution 1	191130	ND
	Elution 2	1205713	513252
	Elution 3	427299	619135
% d'extraction	Elution 1	3	0
	Elution 1+2+3	29	18

ND : Pic de fumonisine non détectable.

On constate que le pourcentage d'extraction aussi bien à la première élution qu'à la somme des trois élutions est moins satisfaisant avec une solution à 5% d'acide acétique. Pourtant, il a été décrit qu'une augmentation d'acidité de la solution d'élution permettait un élution plus importante ou du moins plus rapide [37].

Ainsi, le procédé d'extraction et de purification par les colonnes SAX est très dépendant du pH à tous les niveaux de la manipulation. Les meilleurs résultats que nous ayons obtenu sont ceux pour lesquels :

- le tampon de broyage est constitué de 2mL de méthanol et 4mL de tampon pH 5,8,
- le lavage de la colonne est effectué avec 4mL de solution MetOH/Tp5,8 (3/1),
- l'élution est réalisée avec 10mL de méthanol à 1% d'acide acétique.

C'est cette méthode théorique qui permettrait d'obtenir les chromatogrammes les plus interprétables, avec un pourcentage d'extraction moyen de 40%.

3-1-5. Influence de l'introduction de tensioactifs

Une autre hypothèse pouvant expliquer la mauvaise extraction de la FB1 à partir du foie résulte de la composition de cette matrice notamment sa richesse en lipoprotéines. En effet, il peut se former des micelles au cours du broyage et de l'agitation en solution. Ces micelles peuvent gêner la fixation de la toxine sur la colonne. Nous avons donc testé

l'influence de l'introduction de tensioactifs après le broyage. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9: Influence de l'utilisation de tensioactifs sur l'extraction (colonnes SAX)

Tensioactifs		Tween	Solvesso	PEG	Témoin
Surfaces	Elution 1	ND	ND	ND	ND
	Elution 2	6214696	1832464	2548952	2598996
% d'extraction à l'élution 1 + 2		98	28	40	41

ND : Pic de fumonisine non détectable.

On constate qu'un pic interférent vient gêner la lecture de tous les chromatogrammes sauf celui de l'échantillon témoin. La comparaison du chromatogramme de l'échantillon traité avec du tween et du chromatogramme de l'échantillon témoin est présentée sur la figure 7.

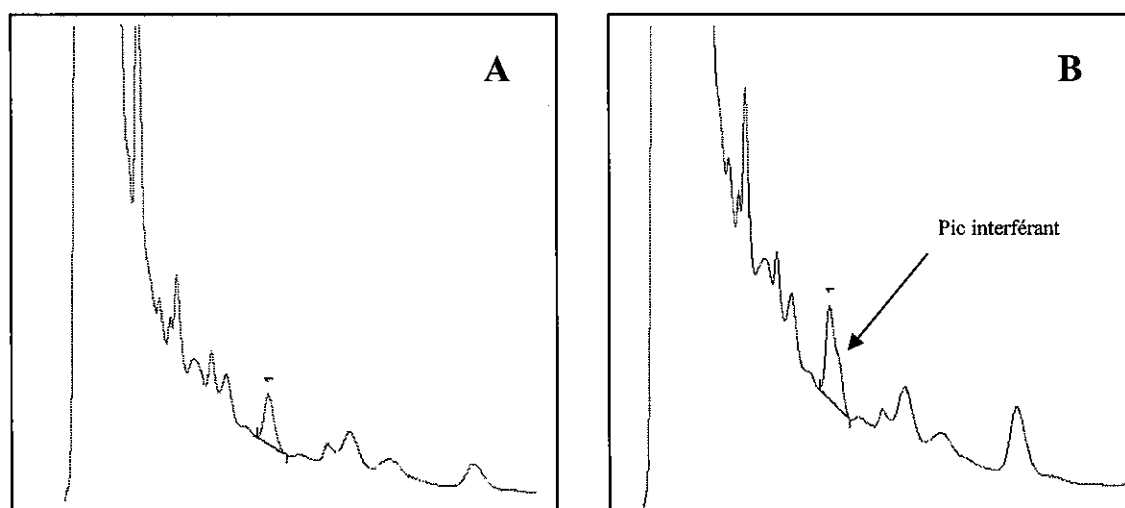


Figure 7 : Comparaison du chromatogramme de l'échantillon témoin (A) et du chromatogramme de l'échantillon traité avec du twin (B) (1 : Pic de fumonisine B1)

L'utilisation de tensioactifs ne donne donc pas les résultats escomptés. L'interprétation des chromatogrammes est gênée. Il serait intéressant d'explorer leur utilisation tout en modifiant les conditions d'analyse par HPLC afin d'obtenir deux pics distincts.

En conclusion, l'utilisation des colonnes SAX ne nous a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants, bien qu'une étude menée sur les tissus de porc avec une méthode quasi identique à la notre ait permis d'obtenir une limite de quantification sur le foie de 10µg/kg [50]. L'utilisation des colonnes pour la purification des échantillons est cependant nécessaire afin de limiter l'encrassement du système HPLC [45]. La purification par des colonnes

greffées C18 n'ayant pas donné de meilleurs résultats, nous avons décidé d'utiliser des colonnes d'immunoaffinité.

3-2. Extraction et purification par colonnes d'immunoaffinité

La purification des échantillons par colonnes d'immunoaffinité est décrite comme la plus sélective. Elle présente cependant une capacité limitée [35, 38].

La réaction antigène/anticorps étant indépendante du pH, l'interférence du foie sur le pH de l'échantillon ne devrait plus gêner. De plus, la forte sélectivité des antigènes pour la toxine devrait permettre une purification plus efficace sur une matrice complexe et riche en molécules lipophiles comme le foie.

Les essais que nous allons présenter sur les colonnes d'immunoaffinité nous ont permis d'avoir un aperçu de la qualité des chromatogrammes et du pourcentage d'extraction. Ils n'ont été réalisés qu'une seule fois, mais certains ont été confirmés et validés par la suite.

3-2-1. Essai de 4 méthodes d'extraction

Les manipulations effectuées sur les colonnes SAX nous ont montré l'importance de la préparation pré-colonne de l'échantillon. Nous avons donc testé les trois méthodes d'extraction proposées par le fabricant, ainsi qu'une méthode incluant une étape de délipidation. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 8.

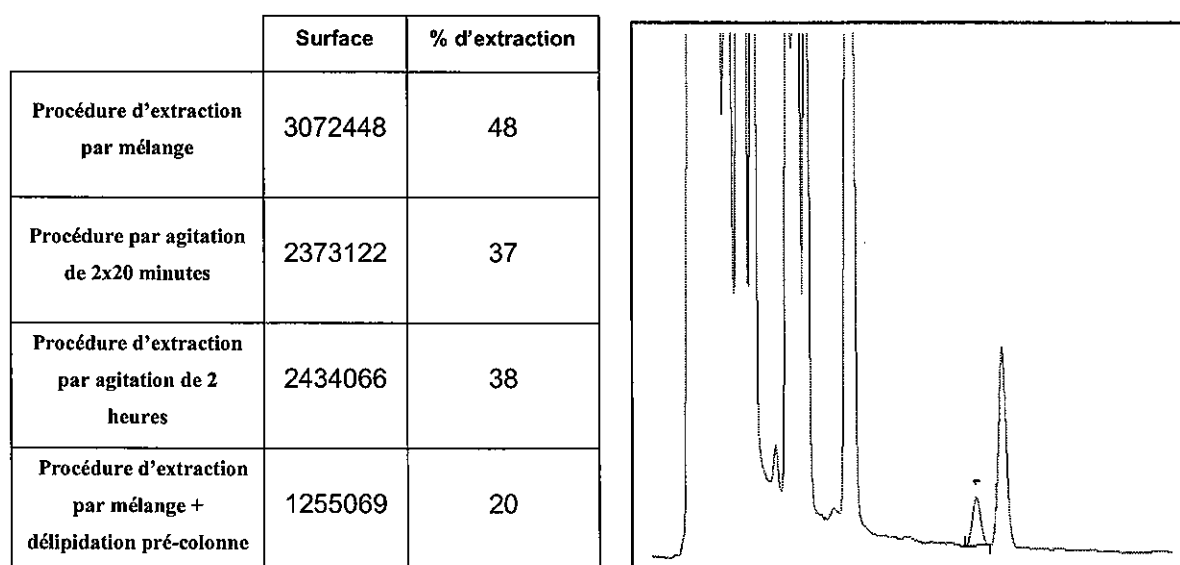


Figure 8: Pourcentage d'extraction et chromatogramme type obtenus par passage des échantillons de foie sur colonnes d'immunoaffinité

Les pourcentages d'extraction obtenus avec les trois méthodes proposées par le fabricant sont semblables. L'introduction d'une étape de délipidation semble diminuer le pourcentage d'extraction. Cependant, cette manipulation n'ayant été réalisée qu'une seule fois, ce résultat est difficilement interprétable (des études de validation de la méthode d'extraction réalisées ultérieurement montreront que les résultats obtenus avec délipidation des échantillons permettent d'obtenir des pourcentages d'extraction satisfaisants).

3-2-2. Optimisation de l'élution

Nous avons voulu optimiser l'étape d'élution. Pour cela, nous avons effectué une seconde élution de la colonne à l'aide de différentes combinaisons d'eau et de méthanol. La première élution est toujours identique : 1,5mL de méthanol suivis de 1,5mL d'eau. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Influence de la composition de la solution d'élution (colonnes d'immunoaffinité)

Elution 1 (mL)	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau
Surface	4741584	2930532	2614124	3125079
Elution 2 (mL)	1,5 Met 1,5 Eau	1,5 Met 1,5 Eau 1,5 Met	1,5 Met 1,5 Eau 1,5 Met	1,5 Met 1,5 Eau 1,5 Met
Surface	ND	ND	ND	ND

ND : Pic de fumonisine non détectable donc inférieur à la limite de détection.

On constate que la toxine est éluee en totalité au cours de l'élution 1 en utilisant successivement 1,5mL de méthanol et 1,5mL d'eau. Cela souligne que nous utilisons la meilleure méthode d'élution. De plus, il a été montré que le solvant d'élution permettant la meilleure récupération du composé était le méthanol [39].

Au final, vu qu'il ne reste plus de composé dans les colonnes après l'élution, il est donc à priori possible de les réutiliser. En effet, si leur capacité de fixation n'est pas atténuée, on ne risque pas de co-éluer de la fumonisine déposée au cour de purifications précédentes. Cette hypothèse reste à vérifier sur des mesures répétées.

4. CONCLUSION : SELECTION D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA FB1 DANS LE FOIE

Choix d'une colonne d'extraction et de purification

Pour traiter les échantillons de tissus de canards, nous avons choisi la méthode d'extraction et de purification par colonnes d'immunoaffinité. En effet, les tracés obtenus sont plus clairs et les pourcentages d'extraction meilleurs. Ces colonnes s'utilisent plus simplement ce qui influe sur la répétabilité et la précision de la méthode. L'inconvénient de ces colonnes reste le prix.

La comparaison de l'utilisation de colonnes SAX et d'immunoaffinité pour l'extraction et la purification est présentée dans le tableau 11.

Tableau 11: Comparaison de l'utilisation de colonnes SAX et d'immunoaffinité pour l'extraction et la purification

Types de colonnes	Avantages	Inconvénients
SAX	Prix (3 euros l'unité) Méthode AFNOR	Temps (extraction 2h, évaporation 8h) Interférence du pH
Immunoaffinité	Temps (extraction 30min, évaporation 4h) Facilité d'utilisation Sélectivité	Prix (20 euros l'unité) Capacité limitée

Choix d'une méthode d'utilisation des colonnes d'immunoaffinité

La méthode décrite par le fabricant pour la préparation de l'échantillon par agitation de 2 heures est retenue pour des raisons pratiques.

La délipidation de l'échantillon avant le passage sur les colonnes est maintenue dans la méthode finale à cause de la richesse en lipides du foie et du risque d'encrassement du système HPLC. Cette étape est également nécessaire pour être sûr de la qualité du pic chromatographique de fumonisine.

L'élution de la colonne d'immunoaffinité est effectuée avec 1,5mL de méthanol, puis 1,5mL d'eau.

La méthode finale utilisée pour la traitement des échantillons sera décrite et validée dans la partie II. Cette description sera précédée d'une introduction générale sur le devenir de la FB1 chez l'animal.

Partie II : Validation d'une méthode de dosage de la FB1 dans le foie, le rein et le muscle de canard et application après administration orale à différentes doses

1. INTRODUCTION : TOXICOCINETIQUE DE LA FB1 CHEZ L'ANIMAL

Les fumonisines sont des composés suspectés cancérigènes chez l'homme, l'étude de leur devenir dans les matrices carnées a donc une importance sanitaire majeure. La contamination animale se fait exclusivement par voie orale. Le maïs et les produits qui en sont dérivés sont les seuls aliments dans lesquels des teneurs importantes de fumonisines ont pu être observées [47].

L'étude de la cinétique d'un xénobiotique est le point de départ de l'étude des résidus dans les tissus et les organes après contamination. Ces études sont généralement réalisées par marquage au ¹⁴C de la fumonisine B1, puis détection de la radioactivité dans les différents organes ou liquides physiologiques. D'autres études sont réalisées après administration de très fortes doses par voie orale et/ou parentérale. Les données sur l'absorption et la distribution de la FB1 après administration par voie orale sont résumées dans les tableaux 12 et 13.

Tableau 12: Absorption de la FB1 après administration par voie orale en fonction des espèces

Espèce	Technique	Tmax	Cmax	Biodisponibilité	Référence
Rats	10 mg FB1/kg PV	1,02 h	0,18 µg/mL	3,5 %	[51]
Porcs	0,35 µCi (0,5 mg) FB1/kg PV	1,10 h	33 ng/mL	3-6 %	[52]
Poules	1,28 µCi (2 mg) FB1/kg PV	1,5-2,5 h	28-103 ng/mL	0,71 %	[53]
Singes	8,7 µCi (6,42 mg) FB1/kg PV	1-2 h	210 ng/mL	2 %	[54]
Vaches	1 et 5 mg FB1/kg PV	Non défini	Non détectée	Négligeable	[55]
Canards	160 mg/kg PV	2 h	5,0 µg/mL	2,7-3,5 %	[45]

Dans la plupart des espèces, les fumonisines sont faiblement absorbées dans le tube digestif. Le pic de concentration plasmatique est observé entre 1 et 2h. La biodisponibilité est inférieure à 4%. Les concentrations maximales de FB1 sont trouvées dans le foie et les reins. Il n'y a pas de métabolisme hépatique mais une hydrolyse partielle dans le tube digestif. L'élimination de la toxine est rapide (temps de demi-vie d'environ 1h). L'excrétion est

majoritairement fécale en raison de la faible absorption. En ce qui concerne la fraction absorbée, l'élimination se fait selon deux voies : urinaire et biliaire [45].

Tableau 13: Distribution de la FB1 après administration par voie orale en fonction des espèces

Espèces	Techniques	Distribution	Références
Rats	0,29 μ Ci (7,5mg) FB1/kg PV	101% de la dose retrouvée dans les fécès après 24h	[56]
Porcs	3 mg FB1/kg d'aliments pendant 12j (soit 3 μ Ci), puis 2 mg FB1/kg d'aliment pendant 12j (soit 2 μ Ci)	Foie = 347 dpm/g 160 ng/g Rein = 146dpm/g 65 ng/g	[57]
	0,35 μ Ci (0,5 mg) FB1/kg PV	10 à 2 fois moins que lors d'IV	[52]
Poules	1,28 μ Ci (2mg) FB1/kg PV	Traces 24h après le gavage dans le jabot, le foie, les reins, l'intestin grêle, le caecum.	[53]
Singes	8,7 μ Ci (6,42 mg) /kg PV	Foie = 0,64% de la dose initiale Muscle = 0,14% Rein = 0,03%	[54]
	3 000 000 dpm 8 mg FB1/kg PV	Muscle = 1% de la dose initiale Foie = 0,4% Cerveau = 0,2%	[58]
Vaches	1 et 5 mg FB1/kg PV	Non détectable, pas d'absorption	[55]
Canards	Pas de données disponibles en VO		

Les méthodes de dosage de la FB1 utilisées dans ces études sont dérivées de celles mises au point sur les matrices végétales. L'extraction et la purification des échantillons sont réalisées par passage sur colonnes échangeuses d'ions. Les protéines doivent être préalablement précipitées en utilisant de l'acétonitrile ou du méthanol [33, 50]. Une délipidation de l'échantillon peut également être effectuée en raison du risque d'encrassement du système HPLC [45]. Le dosage et la quantification sont effectués par HPLC couplée à la détection par fluorométrie. L'agent de dérivatisation de choix est l'OPA [33, 38, 50]. La sensibilité des méthodes de dosage de la FB1 dans le plasma est intéressante avec une limite de détection variant de 0,05 μ g/mL à 0,038 μ g/mL [33, 45]. La technique est reproductible (variations <5%) et précise (>85%) [34, 48]. Le méthode mise au point dans les tissus de porcs par Meyer et al (2003) a permis d'obtenir des limites de quantification sur le foie, le rein et le muscle de 10 μ g/kg, 10 μ g/kg et 5 μ g/kg.

Le but de notre étude est de :

- valider la méthode de dosage préalablement mise au point,
- déterminer la dose de fumonisine la plus faible, administrée à des canards par voie orale, à partir de laquelle la toxine serait détectable dans le plasma et les organes,
- évaluer si le devenir de la FB1 est linéaire pour différentes doses de toxines administrées par voie orale.

Des doses croissantes de FB1 ont donc été administrées par voie orale à des canetons. Les animaux ont été sacrifiés au bout de 120 minute. Ce délai a été choisi car il correspond au Tmax dans le plasma [45]. L'analyse des plasmas de cette étude montre que la toxine n'est plus détectable à partir d'une administration orale de 1,25mg FB1/kg PV [46]. Notre travail a été de déterminer ce seuil dans le foie, les muscles et les reins. Nous allons également pouvoir étudier la répartition de la fumonisine dans ces organes par rapport au plasma. Les étapes de validation de la méthode mise au point précédemment pour doser la FB1 dans le foie, les reins et les muscles seront présentées suivies du dosage dans les tissus.

2. MATERIELS ET METHODES

2-1. Matériels

Le matériel utilisé est le même que décrit dans la partie I-2-1.

2-2. Traitement des animaux

25 canetons mulards issus d'un croisement entre un mâle de barbarie (*Cairina moschata*) et une cane dite « commune » (*Anas platyrhynchos*) ont été utilisés. Ils pèsent environ 250g chacun et proviennent de la société Pyrénées Gascogne Aviculture (l'Isle-Jourdain, France).

Une solution de FB1 à 6mg/mL est réalisée dans du sérum physiologique et contrôlée par dosage. Les canards sont mis à jeun pendant au moins 8h et pesés juste avant l'administration par voie orale de fumonisine à différentes doses, sous un volume d'injection de 10mL/kg PV. Seuls deux canards de l'étude ont reçu un volume de 13ml/kg PV nécessaires à l'obtention de la dose 80mg/kg de FB1. Cinq canards témoins n'ont pas reçu de FB1 mais du sérum physiologique. La répartition des animaux, leurs doses administrées et leurs poids sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Doses de FB1 administrées par voie orale et poids des canards

Doses en mg FB1/kg PV	N° Canard	Poids (g)
0 Témoins	E9-0-1	250
	E9-0-2	316
	E9-0-3	236
	E9-0-4	303
	E9-0-5	273
0,150	E9-150-1	276
	E9-150-2	259
0,306	E9-300-1	298
	E9-300-2	215
0,6125	E9-600-1	274
	E9-600-2	264
1,25	E9-1,25-1	262
	E9-1,25-2	216
2,5	E9-2,5-1	256
	E9-2,5-2	294
5	E9-5-1	222
	E9-5-2	183
10	E9-10-1	264
	E9-10-2	252
20	E9-20-1	226
	E9-20-2	250
40	E9-40-1	275
	E9-40-2	306
80	E9-80-1	216
	E9-80-2	230

Les animaux sont sacrifiés 120 minutes après administration. Ce délai à été estimé comme le temps au bout duquel on obtenait la concentration maximale dans le plasma [45].

Les prélèvements suivants sont réalisés :

- Des échantillons sanguins de 2,5mL de sang sur EDTA sont centrifugés à 2500tr/min durant 15 minutes et le plasma est récupéré, puis placé à -20°C jusqu'à analyse.
- Des échantillons de foie, rein et muscle sont prélevés puis conservés à -20°C jusqu'à analyse.

2-3. Méthode de dosage de la FB1

Les étapes de ce dosage sur le foie, le rein et le muscle sont résumées dans la figure 9.

EXTRACTION EN PHASE LIQUIDE

- Décongélation d'environ 1 g de tissu
- Ajout de 5mL d'eau distillée
- Broyage
- Passage au Potter à 500tr/min
- Ajout de 5mL ACN/MetOH (50/50) et de 0,025g de NaCl
- Agitation 120min à 300mvt/min
- Centrifugation 15min à 5000g
- Reprise de 2mL de surnageant

- Délipidation à l'héxane (répétée deux fois de suite) :
 - ajout de 2 mL d'héxane
 - centrifugation 5min à 4000g
 - évacuation de la phase organique

PURIFICATION

- Reprise des 2mL de surnageant dans 8mL de PBS
- Passage sur colonne d'immunoaffinité
 - Dépôt : 10mL d'échantillon
 - Lavage : 10mL de PBS
 - Elution : 1,5mL de méthanol, puis 1,5mL d'eau distillée

- Evaporation de l'éluât sous air à 55°C

DERIVATISATION

- Reprise de l'extrait sec dans 200µL d'ACN/eau
- Injection de 50µL dans le préparateur/passeur d'échantillons
- Procédé de dérivation :
50µL d'échantillon + 50µL OPA + 50µL d'eau + 50µL tampon borate 8,5
- Injection après 1 minute à température ambiante

DOSAGE HPLC

- Conditions de chromatographie :
 - Volume injecté : 20µL d'extrait dérivatisé
 - Colonne prontosil C18
 - Débit 1mL/min
 - Phase mobile : MetOH/TP phosphate 0,1mol/L pH 3,35 (75/25)
- Condition de détection par fluorescence :
 - $\lambda_{excitation}$ = 335nm
 - $\lambda_{émission}$ = 440nm

Figure 9: Procédés d'extraction, de purification et de dosage de la FB1 dans le foie, les reins et les muscles

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3-1. Validation de la méthode de dosage

La validation de la méthode a été réalisée grâce à des échantillons de tissus supplémentés à partir d'une solution mère à 51,1µg/mL.

Différents critères statistiques sont déterminés: la linéarité, la précision, la limite de détection, et de quantification [48]. Cette étape est nécessaire avant toute tentative de quantification dans nos conditions opératoires.

3-1-1. Linéarité

Il s'agit d'une étude de régression, permettant de vérifier si la réponse du détecteur en fonction de concentrations croissantes en toxine peut-être considérée comme une droite, cette dernière passant ou non par l'origine. Pour cela, une gamme de supplémentations de foies a été réalisée (de 0,01µg/g à 2µg/g), et dosée par la méthode pré-citée. Dans nos conditions opératoires, le temps de rétention de la fumonisine est d'environ 10 minutes. La surface obtenue en fonction de la concentration en FB1 de l'échantillon est présentée sur la figure 10.

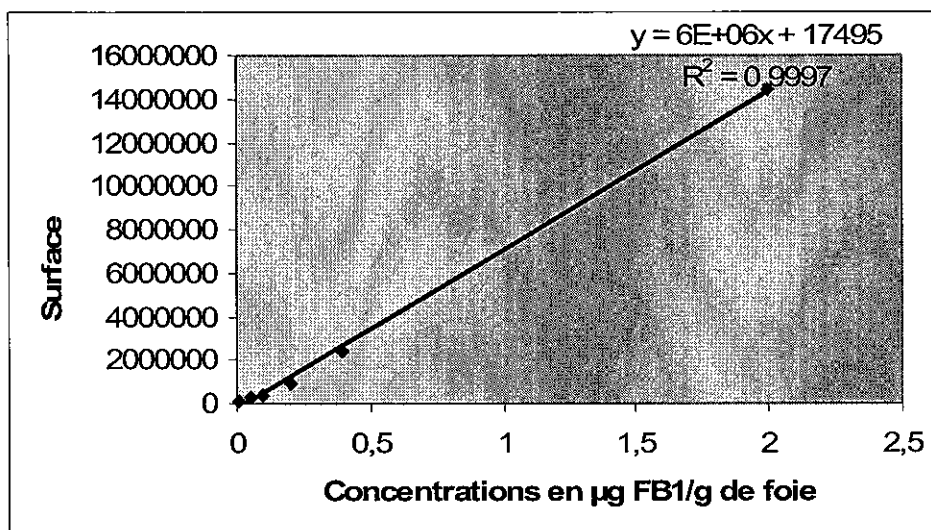


Figure 10: Représentation graphique de la surface obtenue en fonction de concentrations croissantes

La réponse semble linéaire entre des concentrations comprises entre 2 et 0,05µg/g et la réponse obtenue est assimilable à une droite d'équation $y=6^E+6x+17495$. Le coefficient de variation est de 0,9997. Ce dernier ne permet toutefois pas à lui seul de certifier la linéarité, mais il est le reflet de la puissance de liaison entre les deux variables : l'écart entre le r calculé

et 1 dans notre cas est certainement du à une variance résiduelle élevée. Pour vérifier la linéarité, il est nécessaire de calculer le coefficient de variation du facteur de réponse de la droite de régression. Ce calcul est présenté sur le tableau 15.

Tableau 15 : Linéarité de la méthode de dosage

Supplémentation ($\mu\text{g/g}$)	Surfaces	Facteur de réponse			
2	14429565	7214783	7214783	7214783	7214783
0,4	2392675	5981688	5981688	5981688	5981688
0,2	928044	4640220	4640220	4640220	4640220
0,1	386798	3867980	3867980	3867980	3867980
0,05	281398	5627960	5627960	5627960	
0,01	128146	12814600	12814600		
0,005	77502	15500400			
	Moyenne	7949661	6691205	5466526	5426168
	Ecart Type	4846999	3579532	960119	1069552
	CV%	61	53,5	17,6	19,7

Grâce à cette dernière étude statistique, on constate que le coefficient de variation du facteur de réponse est acceptable (17,6%) pour des concentrations comprises entre $0,05\mu\text{g/g}$ et $2\mu\text{g/g}$ et donc nous permet d'affirmer avec une certaine certitude que la réponse est linéaire. Nous pourrions donc utiliser cette droite d'étalonnage pour le dosage ultérieur de nos échantillons entre $0,05\mu\text{g/g}$ et $2\mu\text{g/g}$.

3-1-2. Limites de détection et de quantification

La limite de détection est la plus faible valeur de la grandeur à mesurer, dont la méthode d'analyse permet d'assurer qu'elle n'est pas nulle. On l'estime en évaluant le rapport signal sur bruit qui doit être supérieur ou égal à 2. L'étude d'échantillons blancs nous a permis de fixer la limite de détection de notre méthode est à $0,05\mu\text{g/g}$. Cette même méthode utilisée sur du maïs permet d'obtenir une limite de détection de $0,016\mu\text{g/g}$ [39].

La limite de quantification est la plus petite quantité de toxine à examiner dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites. Elle est estimée à $0,12\mu\text{g/g}$.

3-1-3. Précision

On évalue la précision d'une méthode de dosage par sa répétabilité et sa reproductibilité. La répétabilité est déterminée par l'analyse des mesures effectuées sur le même échantillon, par le même opérateur et sur le même appareil. La reproductibilité est déterminée par l'analyse des mesures en série sur une durée plus ou moins longue. Les résultats de ces études sont présentés dans les tableaux 16.

Tableau 16: Répétabilité et reproductibilité de la méthode de dosage

Répétabilité	
Echantillons	Surfaces
1	2935546
2	3072448
3	2930532
4	2614124
5	3125079
Moyenne	2935546
E-Type	198747
CV %	6,8

Reproductibilité		
Date	Surface	Facteur de réponse
24/04/06	3541584	2777713
25/04/06	3072448	2409763
27/04/06	3125079	2451042
03/05/06	2930532	2298456
05/05/06	2373122	1861272
	Moyenne	32866890
	E-Type	3474946
	CV %	9,5

- Un échantillon de foie supplémenté à $1\mu\text{g/g}$ est divisé en 5 échantillons qui sont extraits le même jours et analysés à la suite. Le coefficient de variation en pourcentage de la surface obtenue est calculé : Sa valeur de 6,8 %, proche de 5%, nous indique que la méthode peut être considérée comme répétable [48].

- Un échantillon de foie supplémenté à $1\mu\text{g/g}$ est divisé en 5 échantillons qui sont extraits et dosés à un ou plusieurs jours d'intervalle. Le coefficient de variation du facteur de réponse est calculé : sa valeur est de 9.5%. Nous avons choisi que la méthode pouvait être considérée comme reproductible, même si cette valeur est légèrement supérieure à 5%, compte tenu des autres résultats de validation [48].

3-1-4. Pourcentage d'extraction

Quatre échantillons de foies ont été supplémentés à $1\mu\text{g/g}$ et traités de la même manière afin d'obtenir le pourcentage d'extraction moyen. Le 100% théorique est obtenu grâce à la moyenne des surfaces obtenues après injection quotidienne d'un standard de concentration équivalente pour lequel aucune procédure d'extraction n'a été réalisée. Le pourcentage d'extraction a aussi été calculé à partir d'une gamme de suppléments. Ces résultats sont présentés dans le tableau 17.

Le pourcentage d'extraction moyen obtenu sur les deux manipulations est de 56%, sachant que l'utilisation de colonnes d'immunoaffinité sur du maïs permet d'obtenir un pourcentage d'extraction moyen de 83% [39].

On constate que le pourcentage d'extraction est stable lorsque les concentrations diminuent. De même, le pourcentage d'extraction obtenu à $2\mu\text{g/g}$ (72%) nous indique qu'il n'y a pas de phénomène de saturation de la colonne pour cette concentration.

Tableau 17: Détermination du pourcentage d'extraction

Supplémentations (µg/g)	% extraction
1	75
1	46
1	41
1	49
Moyenne	53
Eccart-type	15
CV%	28

Supplémentations (µg/g)	% d'extraction
2	72
0,4	60
0,2	46
0,1	60
0,05	56

3-1-2. Validation de la méthode de dosage dans les autres matrices

Les critères statistiques de validation de la méthode de dosage appliquée aux reins et aux muscles sont présentés dans le tableau 18.

Tableau 18: Validation de la méthode de dosage appliquée aux reins et aux muscles

Critères statistiques	Reins	Muscles
Limite de détection (µg/g)	0,05	0,05
% d'extraction	53	49

Ces résultats nous indiquent que l'application de cette méthode de dosage de la FB1 dans les reins et les muscles donne des résultats statistiquement semblables à ceux obtenus dans le foie. Cette méthode va donc pouvoir être utilisée pour le traitement de ces matrices.

3-2. Dosage de la fumonisine B1 dans le foie, les reins et les muscles de canard après administration orale à différentes doses

NB: Nous avons choisi de présenter tous les résultats de l'expérimentation, y compris les valeurs obtenues situées en dessous de la limite de détection provisoire. En effet, il est possible que les limites de détection (LD) que nous avons proposées soient un peu élevées et qu'elles puissent être réévaluées à la baisse par la suite.

3-2-1. Détermination de la plus faible dose orale détectable dans les organes

Les résultats du dosage de la FB1 dans le foie, les reins et les muscles sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19: Dosage de la FB1 dans les échantillons de foie, de rein et de muscle*

Dose administrée VO (mg/kg)	Concentration dans le plasma** (µg/mL)	Concentration dans le foie (µg/g)	Concentration dans les reins (µg/g)	Concentrations dans les muscles (µg/g)
LD provisoire	0,1µg/mL	0,05µg/g	0,05µg/g	0,05µg/g
80	2,812	13,436	1,674	0,83
	3,539	6,768	2,368	0,48
40	2,325	6,696	2,155	0,73
	2,116	3,927	0,95	0,22
20	1,202	1,551	0,728	0,15
	0,825	2,029	0,408	0,08
10	0,215	0,234	0,067	0,06
	0,476	0,41	0,129	0,05
5	0,237	0,285	0,072	0,03
	0,127	0,406	0,11	0,08
2,5	0,203	0,28	0,065	0,02
	0,11	0,054	0,053	0,01
1,25	0,118	0,035	0,143	0,01
	0,148	0,049***	0,03	0,00
0,6125	0,087	0,017	0,014	0,00
	0,091	0,02	0,013	0,00
0,306	0,147	0,01	0,01	0,00
	0,125	0,028	0	0,00
0	0,058	0,023	0,01	0,00
	0,064	0,002	0,003	0,00
	0,076	0	0,003	0,01
	0,077	0	0	0,00
	0,064	0	0	0,00

* Les concentrations inférieures à la limite de détection provisoire sont présentées en italique.

** Dosage effectué au cours d'une étude antérieure [46].

*** Acceptable car très proche de la LD provisoire.

Les résultats obtenus lors du dosage de la FB1 dans le plasma [46] montrent que la plus faible dose administrée par voie orale pouvant être détectée dans le plasma est **1,25mg FB1/kg PV**. En effet c'est à partir de ce niveau d'exposition que les valeurs de concentration plasmatique sont toutes supérieures à la LD. Les valeurs obtenues pour une administration orale de 0,6125mg FB1/kg PV (0,087 et 0,091µg/mL) sont proches de la limite de détection provisoire. Nous avons considéré que ces valeurs avaient pu être minorées pour des raisons analytiques ou expérimentales, comparativement à celles obtenues pour une administration orale de 0,306mg FB1/kg PV (0,147 et 0,125µg/mL).

La quantité minimale de FB1 administrée par voie orale détectable dans le foie 120 minutes après l'administration orale est de $0,049\mu\text{g/g}$. Elle est observée après administration d'une dose de **1,25mg FB1/kg PV**.

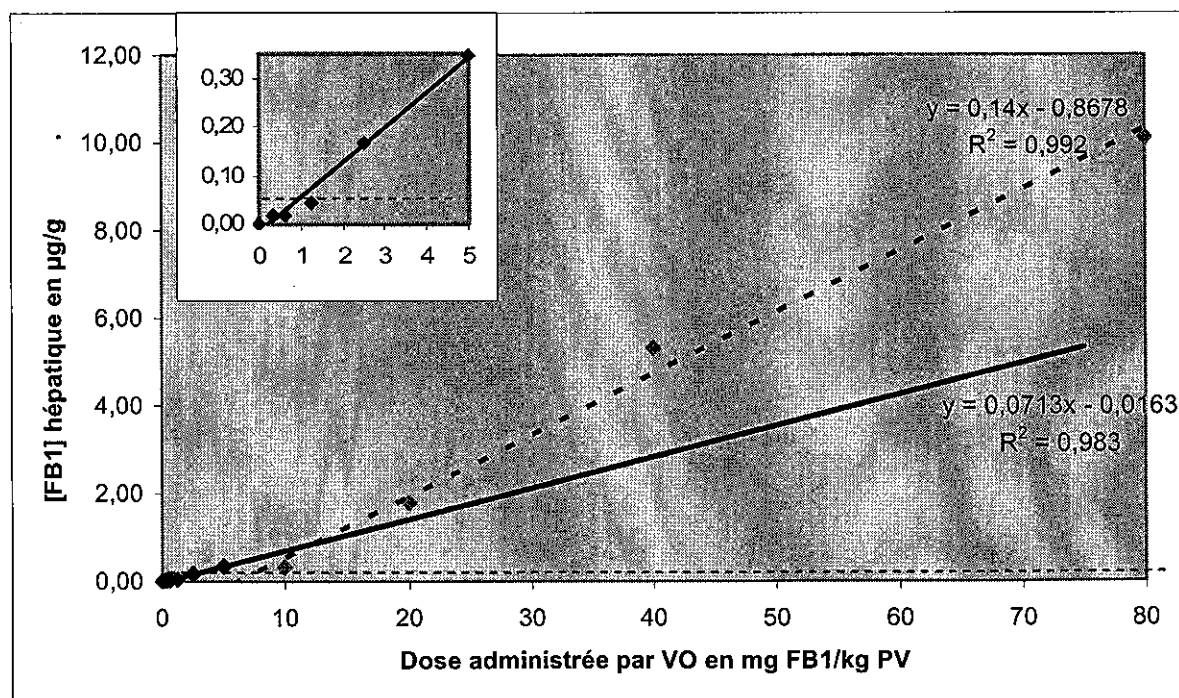
La quantité minimale de FB1 administrée par voie orale détectable dans les reins après 120 minutes est de $0,053\mu\text{g/g}$. Elle est observée après administration d'une dose de **2,5mg FB1/kg PV**. Les doses obtenues dans les reins sont plus faibles que celles obtenues dans le foie et le plasma.

La fumonisine est présente dans le muscle en quantité plus faible. La quantité minimale de FB1 administrée par voie orale détectable dans les muscles après 120 minutes est obtenue pour une administration orale de **5mg FB1/kg PV**.

3-2-2. Représentations graphiques

Nous présenterons successivement les concentrations en FB1 dans le foie, le plasma, le rein et le muscle en fonction de la dose d'administration orale. Ces résultats seront discutés après analyse des différents ratios des concentrations tissulaires en fonction des concentrations plasmatiques en FB1.

La représentation graphique de la moyenne des concentrations hépatiques en FB1 en fonction de la dose d'administration orale est présentée sur la figure 11.



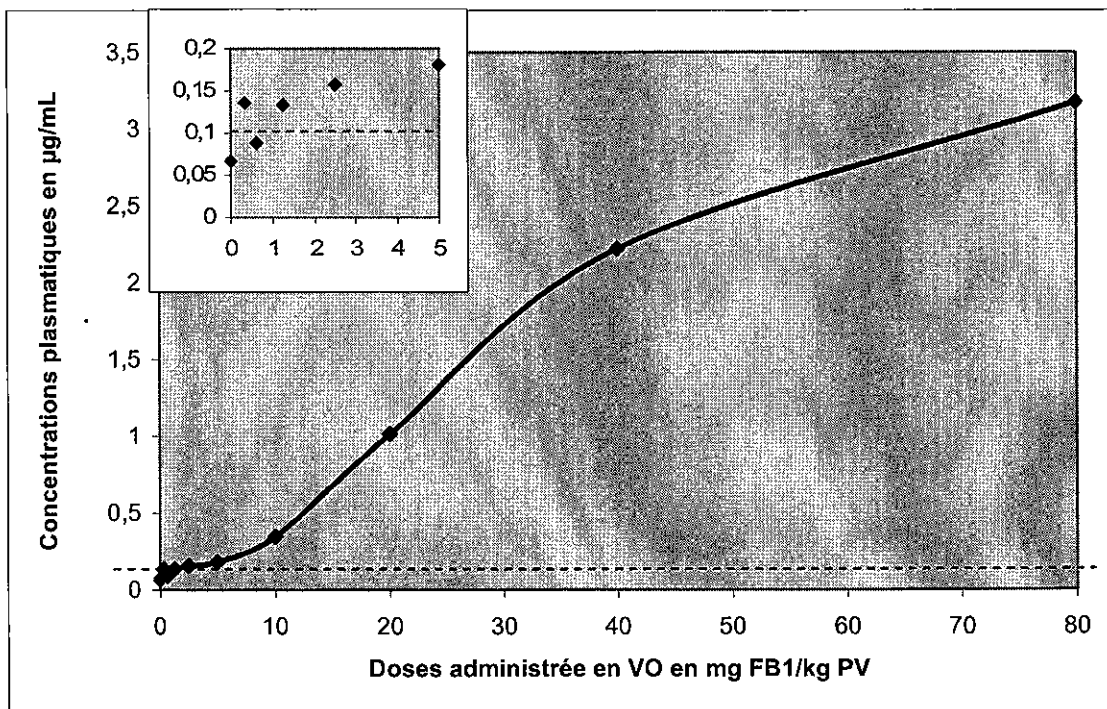
----- Limite de détection provisoire ($0,05\mu\text{g/g}$)

Figure 11: Concentrations hépatiques en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale

Les données obtenues suggèrent, qu'une évolution non linéaire des concentrations hépatiques peut-être obtenue lors d'administration de FB1 à différentes doses. Ces concentrations peuvent être modélisées par deux régressions linéaires comprises respectivement entre 0 et 10mg FB1/kg PV et 10 et 80mg FB1/kg PV d'administration orale. La droite de régression linéaire obtenue sur les valeurs à fortes doses, coupe l'axe des abscisses aux alentours de 5mg FB1/kg PV, ce qui tendrait à montrer qu'en dessous de cette dose orale, on ne retrouve plus de FB1 dans le foie. Or les valeurs obtenues pour une administration à 1,25 et 2,5mg FB1/kg PV sont supérieures ou égales à notre limite de détection. De plus, bien que certaines valeurs de FB1 dans le foie soient inférieures à la limite de détection provisoire lors d'administration d'une dose comprise entre 0 et 10mg FB1/kg PV, leur distribution s'apparente à une régression linéaire de pente inférieure à celle obtenue pour une dose comprise entre 10 et 80mg FB1/kg PV.

Ces résultats montrent que le passage de la toxine du tube digestif au foie est moins important à faible dose. Cela suggère l'existence d'un phénomène de dégradation de la toxine, soit au niveau du tube digestif, soit au niveau du foie, diminuant son absorption à faible dose.

La répartition des concentrations plasmatiques obtenues en fonction de la dose administrée par voie orale est présentée sur la figure 12 [46].

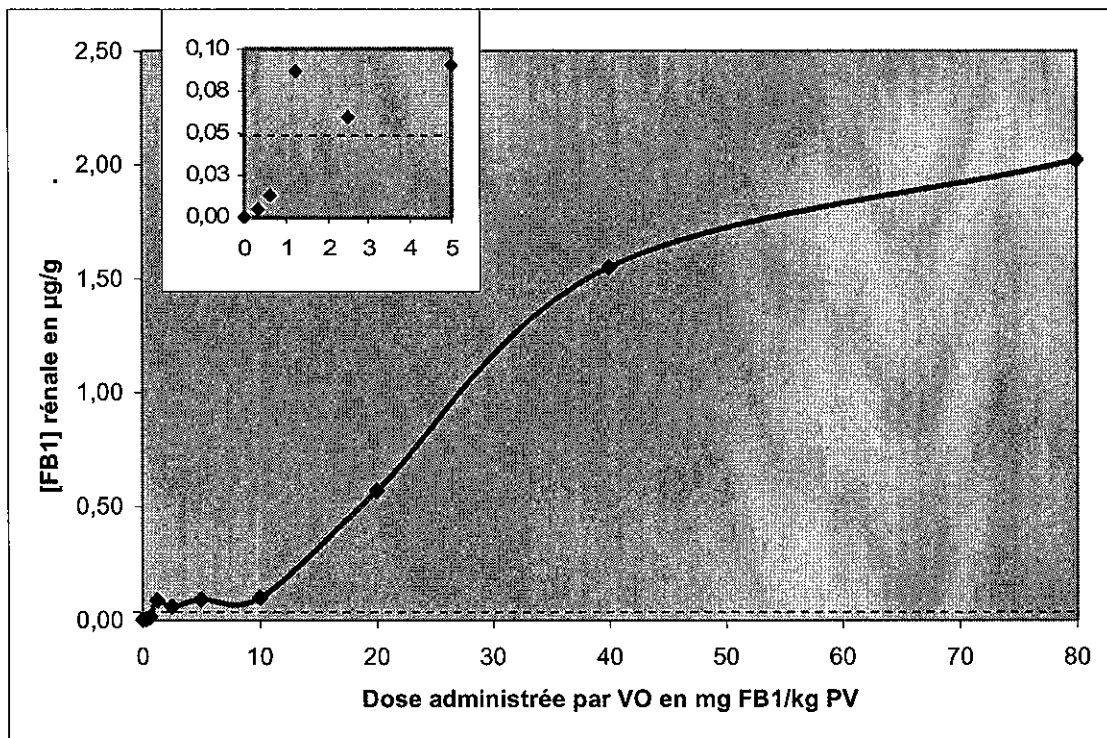


----- Limite de détection provisoire (0,1µg/mL)

Figure 12: Concentrations plasmatiques en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale

Les relations observées suggèrent qu'une évolution non linéaire des concentrations plasmatiques peut-être obtenue lors d'administration de FB1 à différentes doses. Cette évolution des concentrations plasmatiques en fonction de la dose ne peut être ici modélisée par deux régressions linéaires comme dans le foie.

La représentation graphique des concentrations rénales en FB1 en fonction de la dose d'administration orale est présentée sur la figure 13.

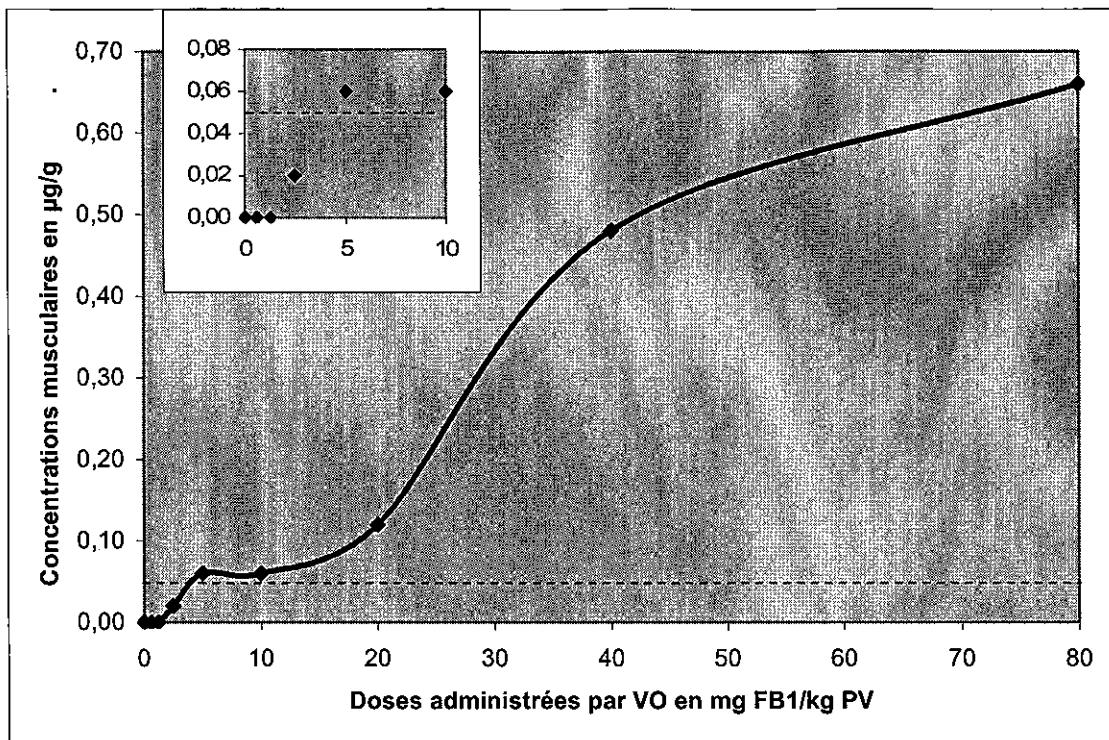


----- Limite de détection provisoire (0,05µg/g)

Figure 13: Concentrations rénales en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale

On constate que la distribution des concentrations rénales en fonction de la dose d'administration orale n'est pas linéaire. L'allure de la courbe obtenue est semblable à celle obtenue dans le plasma.

La représentation graphique des concentrations musculaires en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale est présentée sur la figure 14.



----- Limite de détection provisoire (0,05µg/g)

Figure 14: Concentrations musculaires en FB1 en fonction de la dose administrée par voie orale

On constate que la distribution des concentrations musculaires en fonction de la dose d'administration orale n'est pas linéaire. L'allure de la courbe obtenue est semblable à celles obtenues dans le plasma et les reins.

Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la toxicocinétique de la fumonisine n'est pas linéaire. Les expositions à fortes doses ne sont donc pas à priori directement extrapolables aux expositions à faibles doses.

3-2-3. Ratios des concentrations tissulaires en FB1 en fonction des concentrations plasmatiques

La détermination des ratios des concentrations en FB1 dans les organes et le plasma est présentée dans le tableau 20.

Tableau 20: Ratios des concentrations tissulaires en fumonisine en fonction des concentrations plasmatiques

Doses orales (mg/kg)	$\frac{[FB1]_{\text{foie}}}{[FB1]_{\text{plasma}}}$	$\frac{[FB1]_{\text{rein}}}{[FB1]_{\text{plasma}}}$	$\frac{[FB1]_{\text{muscle}}}{[FB1]_{\text{plasma}}}$
80	3,181	0,636	0,21
40	2,392	0,698	0,22
20	1,766	0,560	0,12
10	0,932	0,284	0,17
5	1,898	0,500	0,33
2,5	1,067	0,377	0,13*
1,25	0,316*	0,650*	0,00*
0,6125	0,208*	0,152*	0,00*
0,3	0,140*	0,037*	0,00*

*Ratio obtenu avec au moins une valeur inférieure à la limite de détection provisoire.

Le ratio $[FB1]_{\text{foie}}/[FB1]_{\text{plasma}}$ a tendance à augmenter lorsque les doses administrées par voie orale augmentent. Il n'existe pas cependant de relation linéaire entre les deux. Ce ratio varie d'un facteur 10 entre une administration de 80mg FB1/kg PV ($[FB1]_{\text{foie}}/[FB1]_{\text{plasma}}=3,181$) et de 1,25mg FB1/kg PV ($[FB1]_{\text{foie}}/[FB1]_{\text{plasma}}=0,316$). En ce qui concerne l'administration à de plus faibles doses, même si les valeurs obtenues sont inférieures à la limite de détection provisoire, on constate que les ratios suivent cette même tendance. Le passage de la molécule du foie vers le plasma se fait donc avec un taux de transfert plus important à faible dose. Ces résultats suggèrent l'existence d'un phénomène de saturation du passage de la toxine du foie vers le plasma à forte dose. La distribution dans le plasma pourrait faire intervenir un mécanisme enzymatique d'extraction de la FB1 à partir du foie.

Le ratio $[FB1]_{\text{rein}}/[FB1]_{\text{plasma}}$ reste relativement stable en fonction des concentrations administrées par voie orale. En effet, les valeurs obtenues restent groupées aux alentours de 0,5. Le ratio calculé pour une administration de 80mg FB1/kg PV ($[FB1]_{\text{rein}}/[FB1]_{\text{plasma}}=0,636$) est très proche de celui calculé à 1,25mg FB1/kg PV ($[FB1]_{\text{rein}}/[FB1]_{\text{plasma}}=0,650$). Le passage de la fumonisine du plasma vers le rein apparaît donc indépendant de la dose d'administration.

Des observations semblables peuvent être réalisées dans les muscles. En effet, on observe peu de variations entre les ratios pour des doses orales de 80 ($[FB1]_{\text{muscle}}/[FB1]_{\text{plasma}}=0,21$), 40 ($[FB1]_{\text{muscle}}/[FB1]_{\text{plasma}}=0,22$) et 10mg FB1/kg PV ($[FB1]_{\text{muscle}}/[FB1]_{\text{plasma}}=0,17$).

Les résultats obtenus dans le rein et le muscle montrent que la distribution de la FB1 du plasma aux reins et aux muscles est indépendante de la dose d'administration. Cela est en faveur d'un mécanisme de diffusion passive du plasma à ces organes.

Notons que chez le rat, après administration orale de 10mg FB1/kg PV, le ratio foie/plasma obtenu est proche de celui obtenu chez le canard dans notre étude ($[FB1]_{\text{foie}}/[FB1]_{\text{plasma rat}}=1,2$ et $[FB1]_{\text{foie}}/[FB1]_{\text{plasma canard}}=0,932$). Ce n'est pas le cas du ratio rein/plasma pour lequel on observe une grande variation ($[FB1]_{\text{rein}}/[FB1]_{\text{plasma rat}}=13$ et $[FB1]_{\text{rein}}/[FB1]_{\text{plasma canard}}=0,284$) [51].

3-2-3. Conclusion

La cinétique de la FB1 en fonction de la dose d'administration orale n'est pas linéaire. Les causes biologiques de cette absence de linéarité restent à déterminer.

La FB1 est détectable dans le plasma, le foie, le rein et le muscle chez des animaux ayant respectivement reçu par voie orale une dose unique de FB1 supérieure à 1,25mg FB1/kg PV, 1,25mg FB1/kg PV, 2,5mg FB1/kg PV et 5mg FB1/kg PV. Les cannetons utilisés dans notre études ingèrent en moyenne 10% de leur poids d'aliment par jour. La FB1 est donc détectable dans la plasma, le foie, les reins et les muscles pour des aliments contaminés respectivement à 12,5ppm, 12,5ppm, 2,5ppm et 50ppm. La commission du 17 août 2006 concernant la présence de mycotoxines dans les produits destinés à l'alimentation animale préconise un seuil à 20ppm dans l'alimentation des volailles. Il est donc vraisemblable que des résidus pourraient être mis en évidence dans les tissus d'animaux consommant des aliments respectant ces limites de contamination, sous réserve de confirmation de nos résultats dans les études futures.

Conclusion générale

L'application aux matrices carnées de la méthode mise au point pour doser la fumonisine dans le plasma utilisant des colonnes SAX, ne nous a pas fourni de résultats interprétables malgré les étapes de mise au point réalisées. L'utilisation des colonnes d'immunoaffinité pour l'extraction et la purification de la fumonisine dans les matrices carnées nous a par contre permis d'obtenir des chromatogrammes interprétables. Cette méthode permet de détecter des concentrations hépatiques, rénales et musculaires supérieures à $0,05\mu\text{g/g}$. Dans ces conditions, de la FB1 est détectable chez des animaux ayant respectivement reçu par voie orale une dose unique de FB1 supérieure à $1,25\text{mg FB1/kg PV}$, $2,5\text{mg FB1/kg PV}$ et 5mg FB1/kg PV .

Les résultats obtenus montrent également que la toxicocinétique de la fumonisine B1 n'est pas linéaire. Les expositions à fortes doses ne sont pas a priori extrapolables aux expositions à faibles doses. Les explications biologiques de cette absence de linéarité restent à déterminer. Le perfectionnement de ces résultats nécessite un abaissement de la limite de détection afin d'étudier plus précisément les phénomènes se produisant à basses concentrations. De plus, il faut noter que cette étude a été réalisée 120 minutes après administration orale. Il serait donc intéressant de doser ces concentrations tissulaires plus tard dans le temps afin d'envisager leur évolution dans le temps et d'étudier les phénomènes d'élimination ou d'accumulation de la fumonisine dans les différents organes.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle AUBY Aliénor, Jeanne, Isabelle

a été admis(e) sur concours en : 2001

a obtenu son certificat de fin de scolarité le :

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, P. GUERRE, Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle AUBY Aliénor, Jeanne, Isabelle

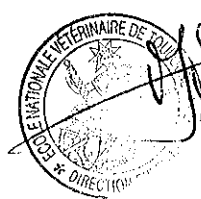
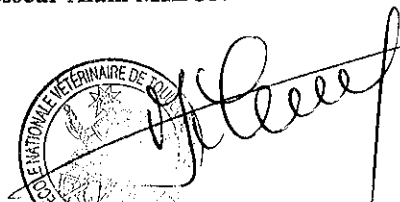
intitulée :

« *Mise au point et application d'une méthode de dosage de la fumonisine B1 dans les matrices cornées.* »

Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Philippe GUERRE



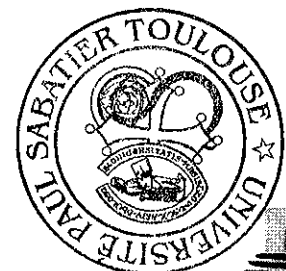
Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Gérard CAMPISTRON



Vu le : 26 OCT. 2006
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Jean-François SAUTEREAU



BIBLIOGRAPHIE

1. Agence Canadienne d'inspection des aliments. Section des aliments du bétail.
CHARMLEY, L.L, TRENHOLM, H.L.
Les mycotoxines, [en ligne].
Adresse URL : <http://www.inspection.gc.ca/francais/anima/feebt/quelnew/mycof.shtml>
2. THIBAUT, N.
Les fumonisines: nature, origine et toxicité.
Thèse ENVT 1997.
3. DUPUY J.
Principales mycotoxines produites par des souches de *Fusarium* isolées de céréales.
Thèse INP Toulouse 1994.
4. LE BARS, J., LE BARS, P., DUPUY, J., BOUDA, H.
Biotic and abiotic factors in Fumonisin B1 production and stability.
JAOAC Int, 1994, **77**, 517-521.
5. SANCHIS, V., RAMOS, A. J., MAGAN, N.
Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: a review of their ecophysiology.
J Food Prot, 2004, **67**, 1792-1805.
6. MARIN, S., SANCHIS, V., MAGAN, N.
Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize.
Can J Microbiol, 1995, **41**, 1063-1070.
7. DUTTON, M.F.
Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effect.
Pharmacol Ther, 1996, **70**, 137-161.
8. APSIMON J-W.
Structure, synthesis and biosynthesis of fumonisin B1 and related compounds.
Environ Health Perspect, 2001, **109**, 245-249.
9. VISCONTI, A., MARASAS, W.F., MILLER, J.D., RILEY, R.
Fumonisin, task3 [en ligne].
Adresse URL :
http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/fusarium/items/5_taskgroupnews.htm
10. WANG, E., NORRED, W., BACON, C., RILEY, R.T., MERRILL, A.H.
Inhibition of sphingolipids biosynthesis by fumonisins; implications for disease associated with *Fusarium moniliforme*.
J Biol Chem, 1991, **266**, 1706-1716.
11. MERRILL, A., VAN-ECHTEN, 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.

12. GELDERBLOM, W.C., SNYMAN, S.D., ABEL, S., LEBEPE-MAZUR, S., SMUTS, C.M., VAN DER WESTHUIZEN, L., MARASAS, W.F., VICTOR, T.C., KNASMULLER, S., HUBER, W.
Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. A chronically fed low dietary levels of fumonisin B1.
Toxicology, 2001, **161**, 39-51.
13. GELDERBLOM W.C., KRIEK, N.P., MARASAS W.F., and THIEL P.G.
Toxicity and carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats.
Carcinogenesis, 1996, **392**, 279-296.
14. TRAN S.T., BAILLY J.D., TARDIEU D., DURAND G., BENARD G., GUERRE P.
Sphinganine to sphingosine ratio and predictive biochemical markers of fumonisin B1 exposure in ducks.
Chemico-Biological Interactions, 2003, **146**, 61-72.
15. KELLERMAN T.S., MARASAS W.F., THIEL P.G., GELDERBLOM W.C., CADWOOD M., COETZER J.A.
Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1.
Onderstepoort J Vet Rev, 1990, **57**, 269-275.
16. BAILLY J.D., RAYMOND I., LE BARS P., GUYOMARD Y., ABADIE J., LE BARS J., GUERRE P., DELVERDIER M. et BURGAT V.
Leucoencéphalomalacie des équidés. Cas rapportés au CNITV.
Rev Med Vet, 1996, **147**, 787-796.
17. MARASAS W.F., KELLERMAN T.S., GELDERBLOM W.C., COETZER J.A., THIEL P.G., VAN DER LUGT J.J.
Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*.
Onderstepoort J Vet Res, 1988, **55**, 197-203.
18. SCHUMACHER J., MULLEN J., SHELBY R., LENZ S., RUFFIN D.C., KEMPPAINEN B.W.
An investigation of the role of *Fusarium moniliforme* in duodenitis/proximal jejunitis of horses.
Vet Hum Toxicol, 1995, **37**, 39-45.
19. CASTEEL S.W., TURK J.R. and ROTTINGHAUS G.E.
Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine.
Fundam Appl Toxicol, 1994, **23**, 518-524.
20. GUZMAN R.E., CASTEEL S.W., ROTTINGHAUS G.E., TURK J.R.
Chronic consumption of fumonisins derived from *Fusarium moniliforme* culture material: clinical and pathological effects in swine.
J Vet Diagn Invest, 1997, **9**, 216-218.
21. ZOMBORSKY M.K., KOVACS F., HORN P., VETESI F., REPA I., TORNAYOS G., TOTTH A.
Investigation into the time- and dose-dependent effect of fumonisin B1 in order to determinate tolerable limit values in pigs.
Livestock Production Science, 2002, **76**, 251-256.

22. EDRINGTON T.S., KAMPS-HOLTZAPPLE C.A., HARVEY R.B., KUBENA L.F., ELISSALDE M.H., ROTTINGHAUS G.E.
Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material.
J Anim Sci, 1995, **73**, 508-515.
23. ESPADA, Y., RUIZ de GOPEGUI, R., CUADRADAS, C., CABANES, F.J.
Fumonisin mycotoxicosis in broilers: plasma proteins and coagulation modifications.
Avian Dis, 1997, **41**, 73-79.
24. HENRY, M.H., WYATT, R.D., FLETCHERT, O.J.
The toxicity of purified fumonisin B1 in broiler chicks.
Poult Sci, 2000, **79**, 1378-1384.
25. BAILLY, J-D., BENARD, G., JOUGLAR, J-Y., DURAND, S., GUERRE, P.
Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducks.
Toxicology, 2001, **163**, 11-22 .
26. KRIEK, N.P., KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.
A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides* (= *F. moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats.
Onderstepoort J Vet Res, 1981, **48**, 129-31.
27. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., STOCKENSTROM, S., SYDENHAM, E.W.
Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based food products.
JAOAC Int, 1996, **79**, 671-677.
28. UENO Y., IJIMA K., WANG S.D., SUGIURA M., SEKIJIMA M., TANAKA T., CHEN C., YU S.Z.
Fumonisin as possible contributory risk factor for primary liver cancer: A 3-year study of corn harvested in Hainem, China, by HPLC and ELISA.
Food Chem Toxicol, 1997, **35**, 1143-1150.
- 29 MARASAS W.F., MILLER J.D, RILEY R.T., VISCONTI A.
International programme on chemical safety
Fumonisin B1.
Env Health Criteria, 2000, **219**.
30. WHO-IARC.
Toxins derived from *Fusarium moniliforme* Fumonisin B1 and B2 and fusarium C.
IARC Lyon (F) 1993.
31. SORIANO, J., DRAGACCI, S.
Occurrence of fumonisins in food.
Food research Int, 2004, **37**, 985-1000.
32. JEFCA, IPCS INCHEM.
Fumonisin [en ligne].
Adresse URL : <http://inchem.org/documents/jefca/jecmono/v47je03.htm>

33. SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E. W.
Determination of fumonisin B1 in plasma and urine by high-performance liquid chromatography.
J Chromatogr, 1992, **574**, 299-304.
34. SHEPHARD, G.S., SYDENHAM, E.W., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.
Quantitative determination of fumonisin B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.
J Liq Chromatogr, 1990, **13**, 2077-2087.
35. ARRANZ, I., BAEYENS, W.R.G, VAN DER WEKEN, G., DE SAEGER, S., VAN PETEGHEM, C.
Review: HPLC determination of fumonisin mycotoxins.
Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, **44**, 195-203.
36. STIOCKENSTROM S., SYDENHAM E., THIEL P.
Determination of fumonisins in corn: evaluation of two purification procedure.
Food Add Contam, 1996, **44**, 909.
37. SYDENHAM, E. W., SHEPHARD, G. S., THIEL, P. G.
Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds.
Mycotoxin Res, 1994, **10**, 9-14.
38. SHEPHARD, G.S.
Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins.
J Chromatogr A, 1998, **815**, 31-39.
39. DUNCAN, K., KRUGER, S., ZAB, E N., KOHN, B., PRIOLI, R.
Improved fluorometric and chromatographic methods for the quantification of fumonisins B1, B2, B3.
J Chromatogr A, 1998, **815**, 41-47.
40. DEPOIRE, AG.
Détermination de la Fumonisine B1 chez le canard après exposition à de faibles doses.
Thèse ENVT 2005.
41. ROTTINGHAUS, G.E., COATNEY, C.E., MINOR H.C.
A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B1 and B2.
J Vet Diagn Invest, 1992, **4**, 326-329.
42. VELASQUEZ C., LLOVERA M., PLANA J., CANELA R.
Effect of solvents on the fumonisins analysis by high-performance liquid chromatography with AccQ.Fluor as derivatizing reagent.
J Chromatogr, 2000, **870**, 469-472.
43. RICE. L.G., ROSS P., DEJONG J.
Evaluation of a Liquid Chromatographic Method for the determination of fumonisins in corn, poultry feed and *Fusarium* culture material.
JAOAC Int, 1995, **78**, 4, 1002-1009.

44. WILLIAMS L.D, MEREDITH F.I., RILEY R.T.
Fumonisin-ortho-phtalaldehyde derivative is stabilized at low temperature.
J Chromatogr B, 2004, **806**, 311-314.
45. BLUTEAU C.
Toxicocinétique de la fumonisine B1 chez le canard.
Thèse ENVT 2005.
46. MATHEZ L.
Perfectionnement de la méthode de détection de la Fumonisine B1 dans le plasma chez le canard.
Thèse ENVT 2006.
47. MARASAS W.F.
Discovery and occurrence of the fumonisins : a historical perspective.
Health Perspect, 2001, **109 suppl 2**, 239-243.
48. LECOMPTE, D.
Validation analytique d'une méthode de dosage par chromatographie liquide.
STP Pharma, 1986, **2**, 843-849.
49. THAKUR R.A., SMITH J.
Detremination of fumonisins B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed and meat using HPLC.
J Agric Food Chem, 1996, **44**, 1047.
50. MEYER K., MORH K., BAUER K., HORN P., KOVACS M.
Residue formation of fumonisin B1 in porcine tissues.
Food Addit Contam, 2003, **20**, 7, 639-647.
51. MARTINEZ-LARRANAGA M.R., ANADON A., DIAZ M.J., FERNADEZ-CRUZ M.L., MARTINEZ M.A., FREJOT M.T, MARTINEZ M., FERNANDEZ R., ANTON R.M., MORALES M.E., TAFUR M.
Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B1.
Vet Hum Toxicol, 1999, **41**, 357-362.
52. PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., SAVARD M.E.
Pharmacokinetic fate of 14C-labelled fumonisin B1 in swine.
Nat Toxins, 1994, **2**, 73-80.
53. VUDATHALA D.K., PRELUSKY D.B., AYROUD M., TRENHOLM H.L., MILLER J.D.
Pharmacokinetic and pathological effects of 14C-fumonisin B1 in laying hens.
Nat Toxins, 1994, **2**, 81-88.
54. SHEPHARD G.S, THIEL P.G., SYDENHAM E., SAVARD M.
Fate of a single dose of 14C-labelled fumonisin B1 in vervet monkeys.
Nat Toxins, 1995, **3**, 145-150.

NOM : AUBY

PRENOM : Aliénor

TITRE : Mise au point et application d'une méthode de dosage de la fumonisine B1 dans les matrices carnées.

RESUME :

La Fumonisine B1 (FB1) est responsable de différentes affections chez l'animal et est suspectée carcinogène pour l'homme. Le but de cette étude est de déterminer la plus petite quantité de FB1 détectable dans le foie, les reins et les muscles de canard après administration orale, et d'étudier sa toxicocinétique dans ces organes. 25 canetons mulards ont reçu des doses de FB1 de 0 à 80 mg FB1 par kg de poids vif par voie orale. Les tissus ont été prélevés 120 minutes après administration. La FB1 a été dosée par HPLC en fluorescence. Une méthode d'extraction et de purification a été mise au point. Elle utilise des colonnes d'immunoaffinité. Les résultats obtenus révèlent une limite de détection de 0,05µg/g de tissu. La FB1 est détectable dans le foie, les reins et les muscles pour une administration orale respective de 1,25, 2,5 et 5mgFB1/ kg PV. Les résultats obtenus suggèrent que la toxicocinétique de la FB1 dans ces organes n'est pas linéaire.

MOTS-CLES : Fumonisine B1 – résidus – HPLC – fluorométrie – canards – tissus –

TITLE : Detection method for Fumonisin B1 in tissues: Improvement and application.

ABSTRACT :

Fumonisin B1 is responsible for various affections in animals and is potentially carcinogenic for humans. The aim of this study is to determinate the smallest quantity of FB1 detectable in ducks liver, kidneys and muscles after oral administration and to study its toxicokinetic in these organs. 25 ducklings were orally administered solutions of 0 to 80 mg FB1 per kg of body weight. Tissues were collected 120 minutes after administration. FB1 was determined by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. An extraction and purification method was first selected. Immunoaffinity columns were used. Our results indicate that the detection limit in tissues is 0,05µg/g. FB1 is detectable in liver, kidney and muscle for respectively 1,25, 2,5 and 5mg FB1/kg PV oral administration. FB1 toxicokinetic was shown not to be linear in these tissues.