

Effets d'une mycotoxine inféodée au maïs, la fumonisine B₁, sur les lymphocytes porcins

Marie-Estelle GOUZE, Isabelle P. OSWALD

I.N.R.A., Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie
B.P. 3, 180 chemin de Tournefeuille, 31931 Toulouse Cedex

Effets d'une mycotoxine inféodée au maïs, la fumonisine B₁, sur les lymphocytes porcins

La fumonisine B₁ (FB₁) est la mycotoxine la plus fréquemment rencontrée de par le monde, elle est principalement produite par *Fusarium verticillioides*, champignon qui contamine le maïs mais aussi le sorgho et le riz. A forte dose, cette mycotoxine entraîne chez le porc, une hépatotoxicité et un oedème pulmonaire. A faible dose, elle augmente la sensibilité des porcelets aux infections microbiennes. Dans cette étude, les effets in vitro de la FB₁ sur les lymphocytes, cellules clé de la réponse immunitaire ont été analysés. Nos résultats montrent que la FB₁ (i) diminue la prolifération des lymphocytes après activation par un agent mitogène (ii) réduit l'activité métabolique de ces cellules et (iii) entraîne un blocage des cellules en phase G₀/G₁ du cycle cellulaire. Les différentes sous populations lymphocytaires étudiées (lymphocyte B, lymphocyte T totaux, lymphocytes T exprimant le marqueur CD4 ou le marqueur CD8) sont toutes sensibles aux effets inhibiteurs de la FB₁. Ces résultats suggèrent que la FB₁ pourrait augmenter la sensibilité de l'hôte aux infections en réduisant les fonctions lymphocytaires.

Effect of Fumonisin B₁, a mycotoxin present in maize, on porcine lymphocytes

The mycotoxin fumonisin B₁ (FB₁) is the most common mycotoxin identified worldwide, it is the principal mycotoxin produced by *Fusarium verticillioides*, a fungus that commonly contaminates corn but also sorghum and rice. At high dose, this mycotoxin induces hepatotoxicity and lung edema in pigs. At low doses FB₁ increases piglets' susceptibility to infectious diseases. The purpose of the present study was to investigate the immunomodulatory effect of FB₁ on lymphocytes, key cells of the immune response. Our results demonstrate that FB₁ (i) inhibits lymphocyte proliferation upon mitogenic activation, (ii) decreases metabolic activity of these cells, and (iii) induces cell cycle arrest in G₀/G₁ phase. The different lymphocyte sub-populations investigated (B lymphocytes, T lymphocytes, T lymphocytes expressing CD4 or CD8 antigens) were all susceptible to FB₁ inhibitory effects. This work suggests that FB₁ could increase host susceptibility to infectious disease by altering lymphocyte response.

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires fongiques susceptibles de contaminer l'alimentation animale et humaine à tous les stades de la chaîne alimentaire. Elles sont capables d'affecter le système immunitaire à des doses inférieures à leur seuil de toxicité (OSWALD et COMERA, 1998). Parmi les mycotoxines, la fumonisine B₁ (FB₁) est la mycotoxine la plus fréquemment rencontrée de par le monde (DUTTON, 1996). Elle est principalement produite par *Fusarium verticillioides*, champignon qui contamine plus particulièrement le maïs mais aussi le sorgho et le riz (SCOTT, 1993; NORRED, 1993). La détection de cette mycotoxine nécessite des méthodes analytiques spécifiques car les épis de maïs peuvent contenir de fortes teneurs en fumonisine tout en ayant une apparence normale. De plus les traitements technologiques, en particulier la cuisson des aliments, ne dénaturent pas cette mycotoxine (LE BARS et al., 1994).

Bien que la découverte de la structure de la FB₁ soit récente (BENZUIDENHOUT et al., 1998), son mode d'action est en partie élucidé. Elle agit sur la voie de biosynthèse des sphingolipides en inhibant de façon compétitive la céramide synthase (MERRILL et al., 1997, RILEY et al., 1998). Cette perturbation de la synthèse des sphingolipides entraîne une accumulation en bases sphingoïdes (la sphinganine et dans une moindre mesure la sphingosine ainsi que leur métabolites) et une déplétion en céramide et en sphingolipides complexes. Cette rupture de métabolisme provoque de nombreux bouleversements biochimiques (RILEY et al., 1998). La fumonisine agirait aussi selon d'autres mécanismes d'action indépendants du métabolisme des sphingolipides mais qui sont moins bien identifiés (RILEY et al., 1998).

L'ingestion d'aliments fortement contaminés en FB₁ induit des mycotoxicoses caractéristiques et différentes selon les espèces : œdème pulmonaire chez le porc, leucoencéphalomalacie chez le cheval, hépatotoxicité chez les rongeurs (THIBAUT et al., 1997). Chez l'homme, une alimentation riche en maïs fortement contaminé par *F. verticillioides* est suspectée d'être en relation avec une forte prévalence de cancers de l'œsophage en Chine et en Afrique du Sud (YOSHIZAWA et al., 1994).

Nous avons récemment montré qu'une intoxication orale de porcelets par de faibles doses de FB₁ altère le système immunitaire des animaux. Ceci provoque une diminution de la synthèse des cytokines inflammatoires dans l'intestin et une augmentation de la sensibilité des animaux aux infections colibacillaires (FOURNOUT et al., 2000). Le but de ce travail était d'analyser *in vitro* les effets de la FB₁ sur les lymphocytes, cellules essentielles du système immunitaire. Nous avons montré que la FB₁ inhibe de façon dose dépendante la prolifération de ces cellules en les bloquant en phase G1 du cycle cellulaire.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Réactifs

La fumonisine B₁ (Promec, Tygerberg, Afrique du Sud) a été dissoute à 1 mM dans l'eau et stockée à 4°C. Les différentes

concentrations utilisées pour les cultures cellulaires ont été réalisées dans du RPMI-1640 (Eurobio, Les Ulis, France).

La concanavaline A (Con A) et Pokeweed Mitogen (PWM) ont été utilisés aux concentrations finales de 10 µg/ml et 2,5 µg/ml respectivement (Sigma, St Quentin Fallavier, France). L'iodure de propidium a été utilisé à la concentration finale de 20 µg/ml dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma) contenant de la RNase A à 6,3 µg/ml.

Les anticorps monoclonaux murins dirigés contre des antigènes porcins : CD2 (clone : MSA 4), CD4 (clone : 74-12-4), CD8 (clone : 76-2-11) (VRMP, Inc, Pullman, U.S.A.) ont été utilisés dilués au 1/50^e dans du PBS contenant 0,3% de BSA (Bovine Sérum Albumine, Sigma). L'anticorps monoclonal murin dirigé contre les chaînes légères des immunoglobulines porcines (clone : K139 3E1) (Serotech, Oxford, U.K.) a été utilisé dilué au 1/10^e dans du PBS-BSA. L'anticorps de chèvre dirigé contre le fragment Fab des immunoglobulines de souris et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Sigma) a été utilisé dilué au 1/100^e dans du PBS-BSA.

1.2. Prélèvement et mise en culture des lymphocytes porcins

Les cellules mononuclées du sang circulant (PBMCs) provenaient de porcelets Large White x Pietrain. Le sang dilué au demi dans du PBS a été déposé sur un coussin d'histopaque (densité 1,077; Sigma) puis centrifugé (2700 tours, 20 minutes) afin de séparer selon un différentiel de densité, le plasma, les PBMCs, les globules rouges et granulocytes. Les lymphocytes ont été recueillis, lavés dans du PBS et centrifugés (1700 tours, 10 minutes). Les globules rouges restants ont ensuite été lysés avec 1 ml d'eau stérile. Après lavage avec du PBS, les cellules ont été remises en suspension dans du RPMI-1640 enrichi avec 2% de sérum de porc (Sigma), de la glutamine à 2 mM (Eurobio) et un cocktail d'antibiotiques et d'antifongique: pénicilline à 100 U/ml, streptomycine à 50 µg/ml et amphotéricine B à 250 µg/ml (Sigma).

Après ensemencement des cellules dans des plaques 6 ou 96 puits, les lymphocytes ont été stimulés par les agents mitogènes et/ou par la fumonisine. Les cellules ont ensuite été incubées pendant des temps variables à 37°C avec 5% de CO₂.

1.3. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules a été estimée après dilution au demi dans du bleu Trypan (Gibco BRL, Eragny, France) et comptage sur cellule de Neubauer.

L'activité métabolique a été mesurée sur les lymphocytes stimulés pendant 48 heures dans des plaques 96 puits avec de la Con A en utilisant le test « cellTiter 96 Aqueous Non radioactive » (Promega, Charbonnières, France). Les cellules ont été incubées pendant 4 heures en présence d'une solution de MTS et la production de formazan soluble a été mesurée à 492 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques Spectro Thermo (TECAN, Trappes, France).

1.4. Analyse du cycle cellulaire

Les lymphocytes ont été mis en culture pendant 48 heures dans des plaques 6 puits (1×10^6 cellules/puits). Après lavage avec du PBS, les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA 1%, pH=7,4) pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont été ensuite perméabilisées avec du triton X100 0,5% et incubées 30 minutes dans une solution d'iodure de propidium (IP). L'analyse du contenu cellulaire a été réalisée par cytométrie de flux à l'aide d'un analyseur Coulter XL 4C.

Pour les doubles marquages (ADN et antigène de surface) les lymphocytes ont été cultivés et fixés de la même façon que précédemment. Les cellules ont été ensuite incubées pendant 30 minutes avec une solution de NH_4Cl 50 mM puis une heure avec une solution de PBS enrichie avec 3% de BSA. Les lymphocytes ont ensuite été incubés (1 heure à 37°C) avec l'anticorps primaire spécifique des marqueurs de surface CD2, CD4, CD8, ou immunoglobuline de surface puis avec l'anticorps secondaire couplé au FITC (30 minutes à 37°C). Après perméabilisation des cellules avec une solution de triton X100, celles-ci ont été incubées avec une solution d'iodure de propidium, 30 minutes à température ambiante. L'analyse simultanée de l'ADN, par l'IP, et des molécules de surface, par un anticorps monoclonal couplé au FITC a été réalisée par cytométrie de flux.

1.5. Analyse statistique

Les résultats sont représentés par leur moyenne $\pm$ l'erreur standard. La comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide d'un test t de Student pour situation bilatérale au seuil de risque $\alpha=5\%$.

2. RÉSULTATS

2.1. Effet de la fumonisine B₁ sur la prolifération des lymphocytes

Dans une première expérience l'effet de la FB₁ sur les lymphocytes porcins a été analysé en déterminant le nombre de cellules vivantes par comptage au bleu trypan avant et après le traitement par la toxine. Comme le montre la figure 1, la stimulation pendant 48 heures des lymphocytes avec la Con A entraîne une prolifération cellulaire et une augmentation des cellules viables. Cependant lorsque les lymphocytes stimulés par la Con A sont incubés en présence de FB₁, une diminution significative du nombre de cellules viables est observée.

Ce premier résultat a été confirmé en déterminant le nombre de cellules métaboliquement actives par une méthode colorimétrique. Des lymphocytes ont été stimulés par la Con A et incubés avec des concentrations croissantes de FB₁ (figure 2). La stimulation par la Con A augmente de façon significative ($p < 0,001$) l'activité métabolique des lymphocytes. Par ailleurs, l'addition de concentrations croissantes de FB₁ provoque une diminution progressive de la prolifération des lymphocytes. L'effet de la FB₁ est visible ($p < 0,05$) dès la plus faible concentration testée (10 μM).

Figure 1 - Effet de la fumonisine B₁ (100 μM) sur la prolifération cellulaire des lymphocytes porcins

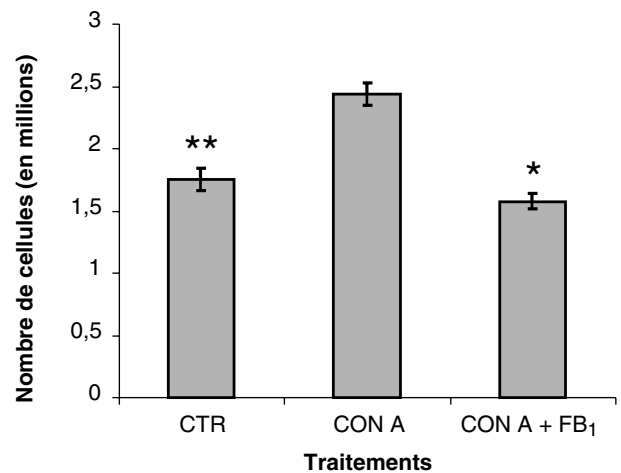
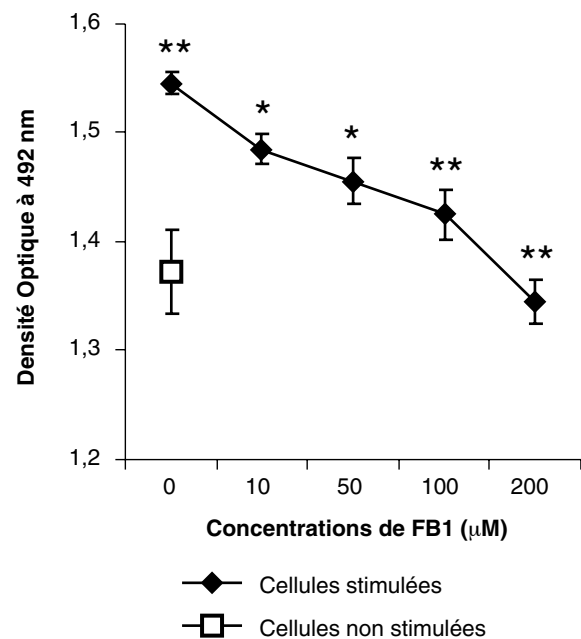


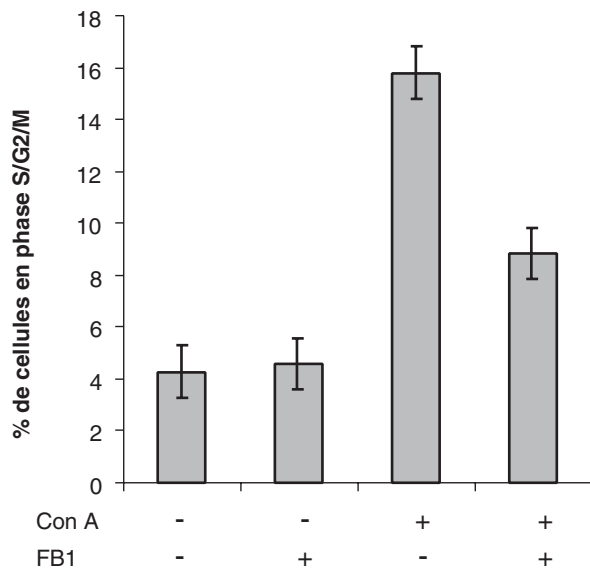
Figure 2 - Effet de la fumonisine B₁ sur l'activité métabolique des lymphocytes porcins



2.2. Effet de la FB₁ sur le cycle cellulaire des lymphocytes

Après avoir montré que la fumonisine B₁ inhibe la prolifération cellulaire, nous avons cherché à déterminer à quel niveau du cycle cellulaire cette toxine agissait. Dans ce but, le cycle cellulaire de lymphocytes contrôles ou stimulés par la Con A a été comparé à celui de lymphocytes incubés en présence de Con A et de 100 μM de FB₁. Comme le montre la figure 3 (p 280) les lymphocytes contrôles sont quiescents (94,9 % en phase G₀/G₁) et une stimulation par la Con A permet de les faire progresser dans le cycle cellulaire ($15,9 \pm 0,5\%$ en phase S/G₂/M). Le traitement par la FB₁ entraîne un blocage des lymphocytes en phase G₁ du cycle cellulaire qui se traduit par une diminution d'environ 50% la proportion de cellules en phase S/G₂/M ($8,8 \pm 1,6$ versus

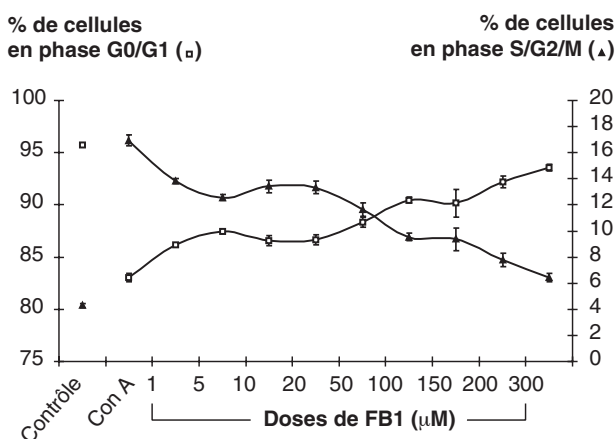
Figure 3 - Effet de la fumonisine B₁ sur la progression des lymphocytes porcins dans le cycle cellulaire



15,9 ± 0,5 %). Par ailleurs, la FB₁ utilisée seule n'a pas d'effet sur le cycle cellulaire.

L'effet de doses croissantes de FB₁ sur le cycle cellulaire des lymphocytes a été ensuite analysé (figure 4). Après stimulation par la Con A, la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est de 83,0 ± 0,4% pour la phase G0/G1 et de 16,9 ± 0,4% pour la phase S/G2/M. Après incubation avec la FB₁, le nombre de cellules en phase G0/G1 augmente de façon progressive en fonction des concentrations de toxine. En parallèle, une diminution des cellules en phase S/G2/M est observée. Les effets de la FB₁ sont visibles dès la plus faible concentration testée c'est-à-dire 1 µM ($p < 0,01$). Comme précédemment, une inhibition d'environ 50% des cellules en phase S/G2/M est observée avec 100 µM de FB₁. Pour une concentration de FB₁ de 300 µM, le nombre de cellules en phase G0/G1 est presque identique à celui de cellules non stimulées : 94,7 ± 0,1% pour les cellules contrôles versus 93,6 ± 0,3% pour les cellules stimulées par la Con A en présence de 300 µM de FB₁.

Figure 4 - Effet de doses croissantes de FB₁ sur la progression des lymphocytes porcins dans le cycle cellulaire

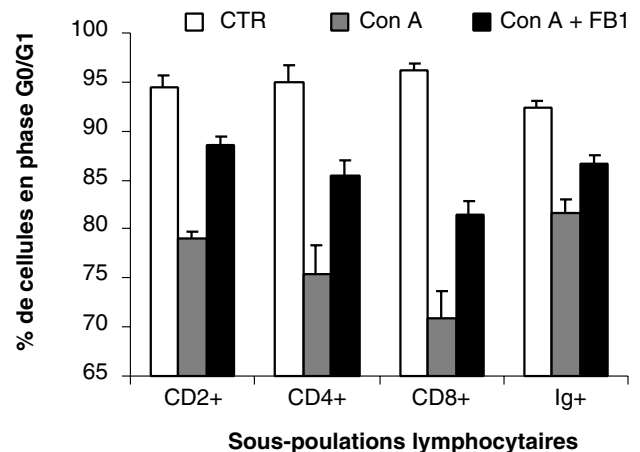


2.3. Effet de la FB₁ sur le cycle cellulaire des différentes sous-populations de lymphocytes

Après avoir étudié les effets de la FB₁ sur le cycle cellulaire de la population totale de lymphocytes, nous avons analysé si cette mycotoxine avait un effet différentiel sur les différentes sous-population de lymphocytes sanguins.

Dans un premier temps, les effets d'un traitement par la FB₁ sur les lymphocytes T totaux (caractérisés par l'expression du marqueur CD2) et sur les sous-populations de lymphocytes T helpers et T cytotoxiques (caractérisés par l'expression des marqueurs CD4 et CD8 respectivement) ont été analysés. La figure 5 représente l'effet de la FB₁ sur la phase G0/G1 du cycle cellulaire de ces trois sous populations. Nous constatons que la stimulation par la Con A, agent mitogène spécifique des lymphocytes T, n'est visible que sur la population CD2+ et n'a pas d'effet sur la population CD2-. Après traitement par la FB₁, nous retrouvons un blocage en phase G0/G1 de la population des lymphocyte T mais également des deux sous-populations qui la composent (T helpers et T cytotoxiques). Quelle que soit la population lymphocytaire T considérée, l'effet inhibiteur de la FB₁ est identique (43%, 40% et 37% de diminution du pourcentage des cellules en phase S/G2/M pour les cellules exprimant le marqueur CD2, CD4 et CD8 respectivement).

Figure 5 - Effet de la fumonisine B₁ (100 µM) sur le cycle cellulaire de différentes sous-populations lymphocytaires porcines



L'effet de la FB₁ a été aussi analysé sur le cycle cellulaire des lymphocytes B. Dans ce but, un double marquage ADN/Immunoglobuline de surface a été effectué après stimulation des lymphocytes B par un agent mitogène spécifique de ce type cellulaire le PWM. Un blocage des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire et une diminution d'environ 27% des cellules en phase S/G2/M (figure 5) est aussi observée après traitement des cellules par la FB₁. Cependant, il semblerait que les lymphocytes B soient moins sensibles à la FB₁ que les lymphocytes T.

3. DISCUSSION

La fumonisine B₁ est une mycotoxine qui contamine les végétaux et particulièrement le maïs. De par son alimentation

riche en maïs, le porc est une espèce très exposée à cette mycotoxine. Par ailleurs, les similarités anatomiques, physiologiques et nutritionnelles entre le porc et l'homme font qu'il constitue un bon modèle d'étude. Nous avons étudié les effets immunomodulateurs de la FB₁ directement sur cet animal cible. Dans un travail précédent, nous avons montré qu'une ingestion de faibles doses de FB₁ augmentait la sensibilité des porcelets à l'infection par des souches pathogènes d'*E. coli* (FOURNOUT et al., 2000). Cette étude avait pour objectif d'analyser si les lymphocytes, cellules essentielles du système immunitaire, étaient sensibles à cette mycotoxine.

Grâce à des mesures de viabilité cellulaire et d'activité métabolique nous avons mis en évidence que la FB₁ provoque une inhibition de la prolifération des lymphocytes porcins. Cet effet anti-prolifératif de la FB₁ a été décrit sur d'autres types cellulaires (hépatocytes de rat, cellules épithéliales rénales de chien, de porc et de singe, macrophages et kératinocytes humains) (TOLLESON et al., 1996, WANG et al., 1996). La cytométrie de flux a permis une analyse plus fine des effets de la FB₁ sur le cycle cellulaire des lymphocytes porcins. En effet, selon le type de cellules, la FB₁ a été décrite comme bloquant le cycle cellulaire en phase G1 sur des cellules CV-1 (CIACCI-ZANELLA et al., 1998) mais aussi en phase G2 sur d'autres types cellulaires (MOBIO et al., 2000, SEEGERs et al., 2000). Nous avons montré que la FB₁ provoque un blocage des lymphocytes en phase G1 du cycle cellulaire les empêchant ainsi de commencer le processus de division cellulaire.

La FB₁ entraîne un blocage de la prolifération lymphocytaire dans toutes les sous-populations lymphocytaires étudiées : lymphocytes T exprimant le marqueur CD4, lymphocytes T exprimant le marqueur CD8 et lymphocytes B. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer dans quelle mesure les capacités fonctionnelles de ces différentes

sous-populations lymphocytaires sont également affectées par la FB₁. En particulier, il faudrait déterminer les effets de cette mycotoxine sur la cytotoxicité (principalement médiée par les lymphocytes T exprimant le marqueur CD8), sur la production d'anticorps par les lymphocytes B et sur la synthèse de cytokines.

Il est à noter que nous avons enregistré cet effet immunosuppresseur de la FB₁ dès de très faibles concentrations de mycotoxine (1 µM). Nous pouvons donc anticiper que, lors d'ingestion de toxines, ces concentrations de FB₁ sont atteintes au niveau sanguin. Le blocage *in vivo* de la prolifération lymphocytaire pourrait empêcher la mise en place d'une immunité spécifique et expliquer la plus grande sensibilité des animaux aux infections concomitantes. Il pourrait aussi entraîner des échecs de vaccination dus à l'absence de mise en place d'une immunité protectrice, comme cela a déjà été décrit pour d'autres mycotoxines (BATRA et al., 1991).

En conclusion, nos travaux montrent un effet immunosuppresseur de la FB₁ et démontrent que cette mycotoxine agit sur les lymphocytes. Des études complémentaires sont nécessaires à la fois pour déterminer *in vitro* les cibles moléculaires de la FB₁, et pour confirmer *in vivo* l'altération de la prolifération lymphocytaire lors d'une ingestion de toxine.

Au niveau européen et au niveau mondial, la détection systématique des mycotoxines dans les produits agricoles est de plus en plus débattue en vue d'établir des seuils de recommandation et/ou de réglementation. Ces seuils ne manqueront pas de conditionner les échanges commerciaux. Une application de ce travail consiste donc à établir, sur l'animal cible, des doses de mycotoxines potentiellement immunodépressives et de participer ainsi à l'établissement de normes réglementaires objectives.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BATRA P., PRITHI A.K., SADANA J.R., 1991. Res. Vet. Sci. 51, 115-119.
- BENZUIDENHOUT S.C., GELDERBLOM W.C.A., GORST-ALLEMAN C.P. 1988. J. Chem. Soc. Chem. Com., 11, 743-745.
- CIACCI-ZANELLA, J. R., MERRIL A.H. Jr, WANG, E., JONES, C. 1998. Food Chem. Toxicol., 36, 791-804.
- DUTTON M.F., 1996. Pharmacol. Ther., 70, 137-161.
- FOURNOUT S., FAIRBROTHER J.M., VERNEUIL S., et al., 2000. Journées Rech. Porcine en France, 32,33-37.
- LE BARS J., LE BARS P., DUPUY J. BOUDRA H., 1994. J. A.O.A.C. Int., 77, 517-521.
- MERRIL A.H. Jr, SCHMELZ, E. M., DILLEHAY, D.L., et al., 1997. Toxicol. Appl. Pharmacol., 142, 208-225.
- MOBIO, T.A., ANANE, R., BAUDRIMONT, I., et al., 2000. Toxicol Appl Pharmacol., 1, 91-96.
- NORRED W.P., 1993. J. Toxicol. Env. Health, 38, 309-328.
- OSWALD I.P., COMERA C., 1998. Rev. Med. Vet., 149, 585-590.
- RILEY R.T., VOSS K.A., NORRED W.P., et al., 1998. Revue Méd. Vét., 149, 617-626.
- SCOTT P., 1993. Int. J. Food. Microbiol., 18, 257-270.
- SEEGERs, J.C., JOUBERT, A.M., PANZER, A., et al., 2000. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, 62, 75-84.
- THIBAUT N., BURGAT V., GUERRE P., 1997. Rev. Med. Vet., 148, 369-388.
- TOLLESON, W.H., MELCHIOR, W.B.Jr., MORRIS, S.M., et al., 1996. Carcinogenesis, 7, 239-249.
- WANG W., JONES C., CIACCI-ZANELLA J., et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 3461-3465.
- YOSHIZAWA T., YAMASHITA A., LUO Y., 1994. Appli. Environ. Microbiol., 60, 1626-1629.