

Effet d'une mycotoxine, la Fumonisine B₁, sur la réponse immunitaire vaccinale chez le porcelet

Ionelia TARANU (1, 2), Daniela MARIN (1, 2), Fiorentina PASCALE (3), Mihaela HABEANU (2), Veronica HEBAN (2),
Jean-Denis BAILLY (4) et Isabelle P. OSWALD (1)

(1) INRA, Laboratoire de Pharmacologie toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille,
31931 Toulouse cedex, France

(2) Institut de Biologie et de Nutrition Animale, Balotesti, Roumanie

(3) Institut Pasteur, Bucarest, Roumanie

(4) Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex, France

Effet d'une mycotoxine, la Fumonisine B₁, sur la réponse immunitaire vaccinale chez le porcelet

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. Dans cette étude, nous avons étudié les effets de cette toxine lorsqu'elle est administrée à faible dose, sur les performances des animaux et sur l'établissement d'une immunité vaccinale anti-*Mycoplasma agalactiae*.

Nos résultats montrent qu'une exposition prolongée (28 jours) à une nourriture contaminée par 8 ppm de FB₁ est sans effet sur la consommation d'aliment, la croissance et l'indice de consommation des porcelets. De même, cette mycotoxine n'altère pas les concentrations sériques des trois sous-classes d'immunoglobulines (Ig G, Ig A et IgM). Par contre l'ingestion d'une nourriture contaminée par la FB₁ diminue de façon significative la synthèse d'anticorps spécifiques anti-*Mycoplasma agalactiae* induite par la vaccination.

Nous avons complété cette étude par des expériences *in vitro* sur des cellules mononuclées du sang périphérique du porc afin de déterminer le mécanisme par lequel la FB₁ pourrait moduler la synthèse des anticorps. Nos résultats indiquent que la FB₁ diminue la synthèse de l'IL-4, cytokine de type Th2 impliquée dans la réponse à médiation humorale et augmente celle d'IFN- γ , cytokine de type Th1 impliquée dans la réponse à médiation cellulaire.

Effect of a mycotoxine, Fumonisin B₁, on the vaccinal immune response in piglets

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. In the present study we investigated the effect of low doses of this toxin on animal performances and on the establishment of a vaccinal immune response towards *Mycoplasma agalactiae*.

Our results demonstrate that a prolonged exposure (28 days) to feed contaminated with 8ppm of FB₁ does not have any effect on feed consumption, animal growth and feed conversion. Similarly this toxin does not modify the serum concentration of the three immunoglobulin subsets (IgG, IgA and IgM). By contrast, ingestion of contaminated feed significantly decreases specific anti-*Mycoplasma agalactiae* antibody after vaccination.

This study was completed by *in vitro* investigations on peripheral blood mononuclear cells to understand the mechanism by which FB₁ can alter antibody production. Our results indicates that FB₁ decreases IL-4 synthesis, a Th2 cytokine involved in humoral response, and increases the synthesis of IFN- γ , a Th1 cytokine involved in cell mediated immune response.

INTRODUCTION

Les conditions agro-climatiques de culture dans les zones tempérées peuvent être favorables au développement de différentes espèces de champignons qui secrètent des mycotoxines. Le développement du champignon peut avoir lieu à n'importe quel stade du développement de la plante mais aussi durant le stockage. La toxinogénèse dépend également de nombreux facteurs : nature et activité hydrique du substrat, température et type de stockage (TOLLESON et al., 1996). Les niveaux de contamination, parfois élevés, retrouvés dans les produits destinés à l'alimentation animale et/ou humaine fluctuent en fonction de l'aliment et du pays.

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, 1996 ; NORRED, 1993). Chez les animaux de rente, la fumonisine provoque des affections variées, deux formes d'évolution fatale étant plus particulièrement caractérisées : la leucoencephalomalacie équine et l'oedème pulmonaire porcin (THIBAUT et al., 1997). Chez l'homme, une alimentation riche en maïs contaminé par *F. verticillioides* est suspectée d'être en relation avec une forte prévalence de cancer de l'oesophage (YOSHIZAWA et al., 1994). A de faibles doses, la FB₁ affecte aussi le système immunitaire (OSWALD et COMERA, 1998). Nous avons récemment montré qu'une intoxication orale de porcelets par de faibles doses de FB₁ altère la synthèse de cytokine et augmente la sensibilité des animaux aux infections colibacillaires (FOURNOUT et al., 2000a).

Dans cette étude, nous avons analysé *in vivo*, les effets de l'ingestion d'un aliment contaminé par la FB₁ sur les performances des porcelets et sur l'établissement d'une immunité vaccinale. Pour cette étude, nous avons mesuré les titres en immunoglobulines totales et les titres en anticorps spécifique anti-*Mycoplasma agalactiae* lors d'une réponse primaire et secondaire. Ce travail a été complété par des expériences *in vitro* sur des cellules mononuclées du sang périphérique du porc afin de déterminer le mécanisme par lequel la FB₁ pourrait moduler la synthèse des anticorps.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux et protocole expérimental

L'expérience a été réalisée sur 20 porcelets sevrés répartis en 2 groupes sur la base de leurs poids vifs. La moitié des animaux a reçu *ad libitum* un aliment témoin tandis que l'autre moitié a été nourrie avec le même aliment supplémenté avec un extrait enrichi en FB₁. Cet extrait a été obtenu par infection artificielle de maïs avec une souche de *Fusarium verticillioides* fortement productrice et a été incorporée dans la nourriture à raison de 8 mg/kg d'aliment.

Le poids vif des porcelets a été mesuré en début d'essai puis de façon hebdomadaire ainsi que la consommation d'aliment. Sept et 21 jours après le début de l'expérience, les

porcelets ont été vaccinés avec 1 mL d'Agavac (Institut Pasteur, Bucarest, Roumanie). Ce vaccin est composé d'une combinaison de souches inactivées de *Mycoplasma agalactiae*, diluée dans de l'hydroxyde d'alumine.

Au début (J0), au milieu (J22) et à la fin (J28) de l'expérience, des prélèvements sanguins ont été effectués afin de déterminer la concentration sérique en immunoglobulines totales et en anticorps spécifiques.

1.2. Dosage des anticorps

La concentration totale des immunoglobulines de type A, G et M a été dosée par ELISA (Bethyl, Interchim, Montluçon, France) après la dilution de sérums au 1/2000 (IgA), 1/100000 (IgG) et 1/8000 (IgM) comme précédemment décrit (GROSJEAN et al., 2002).

La concentration des anticorps spécifiques anti-*M. agalactiae* a également été déterminée par ELISA selon le protocole décrit par MARIN et al., (2002).

1.3. Dosage de l'expression des cytokines

Des cellules mononuclées du sang circulant (PBMCs) ont été isolées à partir de sang périphérique de porcelets contrôles (GOUZE et OSWALD, 2001) et remis en suspension dans du RPMI-1640 enrichi avec 2 % de sérum de porc (Sigma, St Quentin-Fallavier, France), de la glutamine à 2 mM (Eurobio, Les Ulis, France) 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 24 puits, les PBMC ont été stimulées par 10 µg/ml de concanavaline A (Sigma) et par 100 µM de FB₁ purifiée (Promec, Tygerberg, Afrique du Sud). Après une incubation de 24 heures à 37°C avec 5 % CO₂, le culot cellulaire a été repris dans 1 mL de Trizol (Gibco, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) pour doser les ARNs messagers codant pour deux cytokines (IFN-γ et IL-4) comme précédemment décrit (DOZOIS et al., 1997 ; FOURNOUT et al., 2000b).

2. RÉSULTATS

2.1. Effet de l'ingestion d'aliment contaminé par la FB₁ sur la croissance des animaux

L'expérience a porté sur 20 porcelets, la moitié des animaux a reçu pendant 28 jours une nourriture contaminée par 8 ppm de FB₁, les autres porcelets ont été gardés comme témoin. Aucun signe clinique et aucune mortalité n'ont été observés au cours de l'expérience quel que soit le groupe d'animaux considéré. Tous les porcelets ont été pesés de façon hebdomadaire afin de déterminer leur gain de poids durant l'expérience. La consommation d'aliment a également été évaluée et l'indice de consommation calculé. Comme le montre le tableau 1, la consommation d'une nourriture contaminée par 8 ppm de FB₁ n'a pas d'effet sur la quantité d'aliment consommé, la vitesse de croissance des porcelets et leur indice de consommation.

Tableau 1 - Effet de la FB₁ sur les performances des porcelets

Paramètres	Aliment témoin	Aliment contaminé (FB ₁)	Effet de l'aliment
Poids début essai / (kg)	12,26 ± 0,75	12,26 ± 0,79	NS
Poids fin essai / (kg)	28,67 ± 1,60	27,55 ± 3,12	NS
Consommation moyenne (kg/jour)	1,19 ± 0,01	1,03 ± 0,1	NS
Gain de poids moyen (kg/jour)	0,59 ± 0,03	0,55 ± 0,03	NS
Indice de consommation	1,95 ± 0,06	1,73 ± 0,05	NS

Tableau 2 - Effets de la fumonisine B₁ sur la concentration sérique des différentes classes d'immunoglobulines

Classe d'Ig	Jour	Aliment témoin	Aliment contaminé (FB ₁)	Effet de l'aliment
Ig A (mg/mL)	0	0,600 ± 0,17	0,546 ± 0,14	NS
	21	0,947 ± 0,48	1,149 ± 0,69	NS
	28	1,526 ± 0,41	1,741 ± 0,73	NS
Ig G (mg/mL)	0	7,1 ± 2,01	7,15 ± 3,01	NS
	21	15,37 ± 7,07	18,31 ± 5,40	NS
	28	22,50 ± 3,15	22,52 ± 3,77	NS
Ig M (mg/mL)	0	1,97 ± 0,17	1,75 ± 0,18	NS
	21	2,37 ± 0,45	2,87 ± 0,43	NS
	28	3,50 ± 0,88	3,90 ± 0,55	NS

2.2. Effet de l'ingestion d'aliment contaminé par la FB₁ sur la production d'anticorps

Nous avons ensuite étudié les conséquences d'une alimentation contaminée par la FB₁ sur la réponse humorale des animaux. Dans ce but, nous avons mesuré dans les sérums de tous les porcelets, la concentration en anticorps totaux (tableau 2) et en anticorps spécifiques (figure 1). Les sérums ont été prélevés au début de l'expérience (J0) ainsi qu'à 22 et 28 jours de traitement afin de mesurer le niveau basal des anticorps ainsi que les réponses primaire (J22) et secondaire (J28) des porcelets à la vaccination.

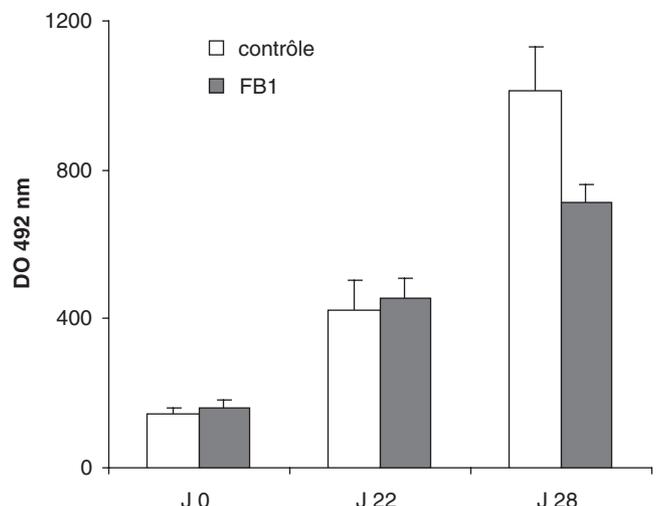
Comme le montre le tableau 2, la concentration des différentes sous-classes d'immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) évolue avec l'âge des animaux pour atteindre des valeurs comparables à celles des adultes au dernier prélèvement (J28). Par contre, l'ingestion d'aliment contaminé par la FB₁ n'influe pas sur les concentrations totales de ces 3 sous-classes d'immunoglobulines.

Nous avons également analysé les conséquences d'une ingestion d'aliment contaminé sur le développement d'une réponse immunitaire spécifique induite lors d'une vaccination anti-*Mycoplasma agalactiae*. Les résultats présentés dans la figure 1 indiquent que les deux immunisations, réalisées à J7 et J21 du protocole expérimental, induisent la synthèse d'anticorps spécifiques, décelables par ELISA dans les deux groupes de porcelets ($p < 0,05$). Cette figure montre également que l'ingestion de FB₁ diminue les titres en anticorps observés lors des réponses primaire (J22) et secondaire (J28). L'analyse statistique révèle cependant que seule la

réponse secondaire anti-*M. agalactiae* est significativement diminuée par la consommation de mycotoxine (figure 1).

2.3. Analyse du mécanisme d'action de la FB₁ sur la production d'anticorps

Le deuxième objectif de ce travail était d'analyser le mécanisme d'action par lequel la FB₁ altérait la réponse humorale. Nous avons donc étudié *in vitro* les effets de cette mycotoxine sur la production de cytokines en insistant sur la dichotomie entre les cytokines de type Th1 et Th2. En effet, la production de l'un ou l'autre de ces types de cytokines

**Figure 1** - Effet de la FB₁ sur la synthèse des anticorps anti-*Mycoplasma agalactiae*

conditionne le type de réponse développée par l'animal (réponse à médiation humorale induite par les cytokines de type Th2 versus réponse à médiation cellulaire induite par les cytokines de type Th1). Nos résultats présentés dans la figure 2 montrent clairement que la FB₁ diminue la synthèse *in vitro* des ARNs messagers codant pour l'IL-4 (cytokine Th2) par les lymphocytes porcins alors qu'elle augmente celle de l'IFN- γ (cytokine Th1). Des résultats similaires, diminution de la réponse Th2 et augmentation de la réponse Th1, ont été obtenus, *in vivo* chez des animaux ayant consommé de la FB₁ pendant une courte période (résultats non présentés).

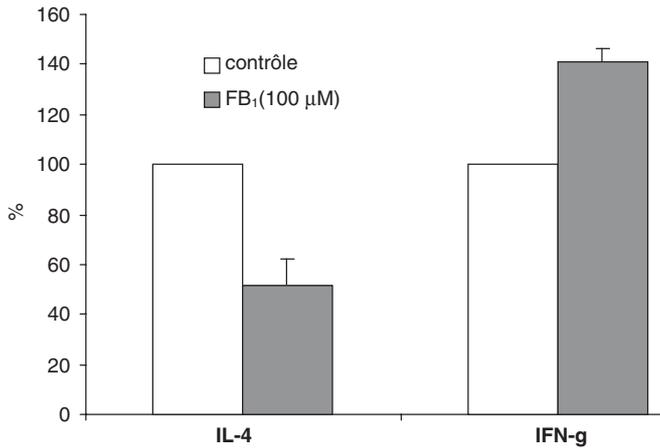


Figure 3 - Effet de la FB₁ sur la production d'ARNs messagers codant pour IL-4 et IFN- γ par les PBMC porcins lors d'une stimulation mitogénique

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'*Escherichia coli* (FOURNOUT et al., 2000a). Cette étude avait pour objectif d'analyser les effets de cette mycotoxine sur la réponse vaccinale.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'une exposition prolongée (28 jours) à une nourriture contaminée par 8 ppm de FB₁ est sans effet sur la consommation d'aliment, la croissance et l'indice de consommation des porcelets. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par ZOMBORSKY et al., (2000) qui montrent que des aliments contaminés par 0, 10, 20 ou 40 ppm de FB₁ n'ont pas d'effet sur la croissance et sur la consommation des porcelets. Par contre, ROTTER et al., (1996) ont montré une diminution de gain de poids de 8 % et 11 % chez les porcelets mâles nourris avec un aliment contenant 1 et 10 ppm de FB₁ respectivement.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les conséquences d'une alimentation contaminée par la FB₁ sur la production d'anticorps. Nous avons analysé à la fois la production totale des différentes sous-classes d'immunoglobulines et la production des anticorps spécifiques. Le dosage de taux d'immunoglobulines sériques montre une très légère augmentation de ces taux chez les animaux recevant une nourriture contaminée. Ces résultats concordent avec l'étude de TRYPHOMONAS et al., (1997) qui montre une tendance à l'augmentation des IgG chez des rats recevant 15 ou 25 mg/Kg poids vif de FB₁ pendant 14 jours. A l'inverse, l'ingestion pendant 2 semaines d'une nourriture contaminée par un mélange de fumonisine B₁, B₂ et de moniliformine à des concentrations respectives de 61, 10.5 et 42,7 ppm entraîne une diminution significative des IgG chez les poulets (QURESHI et al., 1995).

Au niveau de la réponse spécifique, nous avons mis en évidence une diminution significative du taux d'anticorps anti-*Mycoplasma agalactiae* chez des porcelets recevant une nourriture contaminée avec 8 ppm de FB₁. Cette diminution apparaît dès la réponse primaire et est accentuée lors de la réponse secondaire induite lors du rappel vaccinal. Une diminution du taux en anticorps spécifiques a également été observée chez des dindes vaccinées contre le virus de Newcastle nourries pendant 4 semaines avec un aliment contaminé par 200 ppm de FB₁ (LI et al., 2000). La diminution d'anticorps spécifiques a aussi été observée chez des porcelets recevant une autre mycotoxine, l'Aflatoxine B₁ (JOENS et al., 1981 ; MARIN et al., 2002).

Ce travail a également permis de déterminer un mécanisme d'action de la FB₁. Nos résultats montrent que cette mycotoxine altère la balance entre les cytokines Th1 et Th2, elle diminue la production d'IL-4 (cytokine Th2) et augmente celle d'IFN- γ (cytokine Th1). Sachant que les cytokines Th2 sont impliquées dans le développement de la réponse humorale et la production d'anticorps (SHER et COFFMAN, 1992), nous faisons l'hypothèse que la diminution de la production d'IL-4 est responsable de la diminution de la synthèse d'anticorps spécifiques lors de la vaccination. Une seule étude a analysé la production de cytokines régulatrices chez des animaux recevant une nourriture contaminée avec de la FB₁ (THEUMER et al., 2002). Elle montre que les splénocytes de rats ayant ingéré pendant 12 semaines 100 ppm de FB₁ produisent moins d'IL-4 que les animaux ayant reçu une nourriture témoin.

En conclusion, nos travaux indiquent que l'ingestion de FB₁ est capable d'altérer l'immunité vaccinale. Ceci peut avoir des conséquences importantes en santé humaine ou animale où l'on compte sur la vaccination pour prévenir les infections. En effet, la contamination des aliments par les mycotoxines pourrait conduire à une rupture de l'immunité vaccinale et, à terme, provoquer l'émergence de maladies infectieuses même dans des troupeaux convenablement vaccinés. Des études complémentaires sont nécessaires à la fois au niveau fondamental pour déterminer les cibles de la FB₁ sur le système immunitaire, mais aussi à un niveau plus appliqué pour déterminer les doses maximales tolérables dans l'alimentation animale ne provoquant pas une diminution de l'efficacité vaccinale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- DUTTON M.F., 1996. *Pharmacol. Ther.*, 70, 137-161.
- DOZOIS C.M., OSWALD E., GAUTIER N., SERTHELON J.P., FAIRBROTHER J.M., OSWALD I.P. 1997. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 287-300.
- FOURNOUT S., FAIRBROTHER J.M., VERNEUIL S., LE BARS P., LAFFITTE J., LE BARS J. OSWALD I.P. 2000a. *Journées Rech. Porcine en France*, 32, 33-37.
- FOURNOUT S., DOZOIS C.M., ODIN M., DESAUTELS C., PERES S., HERAULT F., DAIGLE F., SEGAFREDO C., LAFFITTE J., OSWALD E., FAIRBROTHER J.M., OSWALD I.P. 2000b. *Infect. Immun.*, 68, 839-847.
- GOUZE M. E., OSWALD I., 2001. *Journées Rech. Porcine*, 33, 277-281.
- GROSJEAN F., TARANU I., SKIBA F., CALLU P., OSWALD I., 2002. *Journées Rech. Porcine*, 34, 333-339.
- JOENS L.A., PIER A.C., CUTLIP R.C. 1981. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1170-1172.
- LI Y.C., LEDOUX D.R., BERMUDEZ A.J., FRITSCH K.L., ROTTINGHAUS G.E. 2000. *Poultry Science*. 79, 871-878
- MARIN D.E., TARANU I., BUNACIU R.P., PASCALE F., TUDOR D.S., AVRAM N., SARCA M., CUREU I., CRISTE R.D., SUTA V., OSWALD I.P., 2002. *J. Anim. Sci.* 80, 1250-1257.
- NORRED W.P., BACON C.W., PLATTNER R.D., VESONDER R.F., 1991. *Mycopathologia*, 115, 37-43.
- OSWALD I.P., COMERA C., 1998. *Rev. Méd. Vét.*, 149, 585-591.
- QURESHI M.A., GARLICH J.D., HAGLER W.M., WEINSTOCK D., 1995. *Immunopathol. Immunotoxicol.*, 17, 791-804.
- ROTTER B.A., THOMPSON B.K., PRELUSKY D.B., TREHOLM H.L., STEWART B., MILLER J.D., SAVARD M.E., 1996. *Nat. Toxins.*, 4, 42-50.
- SCOTT P.M., 1993. *Int. J. Food. Microbiol.*, 18, 257-270.
- SCOTT P.M., 1996. *JAOAC*, 79, 875-882.
- SCOTT P.M., LAWRENCE G.A., 1996. *Food. Addit. Contam.*, 13, 823-832.
- SHER A., COFFMAN R.L., 1992. *Ann. Rev. Immunol.* 10, 385-409.
- THIBAUT N., BURGAT V., GUERRE P., 1997. *Rev. Méd. Vét.*, 148, 369-388.
- THEUMER M.G., LOPEZ A.G., MASI H.D.T., CHULZE S.N., RUBINSTEIN H.R., 2002. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9, 149-155.
- TOLLESON W.H., DOOLEY K., SHELDON W.G., THURMAN D.J., BUCCI T.J., HOWARD P.C., 1996. L. Jackson et al. Edit. Plenum Press, New York, pp. 237-249.
- TRYPHONAS H., BONDY G., MILLER J.D., LACROIX F., HODGEN M., MEGUIRE P., FERNIE S., MILLER J.D., HAYWARD S., 1997. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 39, 53-59.
- ZOMBORSZKY M.K., VETESI F., REPA I., KOVACS F., BATA A., HORN P., TOTH A., ROMVARI R., 2000. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* ,47, 277-286.
- YOSHIZAWA T., YAMASHITA A., LUO Y., 1994. *Appli. Environ. Microbiol.*, 60, 1626-1629.

