

## Effet de la Fumonisine B<sub>1</sub>, une mycotoxine inféodée au maïs, sur les cellules épithéliales intestinales porcines

Sandrine BOUHET, Edith HOURCADE, Asmaa FIKRY, Stéphanie MARTINEZ et Isabelle P. OSWALD

INRA, Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille, 31931 Toulouse cedex

### Effet de la Fumonisine B<sub>1</sub>, une mycotoxine inféodée au maïs, sur les cellules épithéliales intestinales porcines

La fumonisine B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) est la mycotoxine la plus fréquemment rencontrée de par le monde. Elle est produite par *Fusarium verticillioides*, un champignon qui contamine principalement le maïs. Elle provoque diverses pathologies chez les animaux domestiques, y compris chez le porc. L'épithélium gastro-intestinal étant le premier tissu exposé, nous avons analysé les effets de la FB<sub>1</sub> sur une lignée de cellules épithéliales intestinales porcines, la lignée IPEC-1. Dans un premier temps, nous avons étudié la lyse cellulaire (cytotoxicité) causée par des doses croissantes de FB<sub>1</sub>. Nous avons montré que des doses de FB<sub>1</sub> inférieures à 50 µM n'induisent pas de cytotoxicité pour des cellules en division et qu'il faut atteindre des concentrations de 700 µM pour induire une toxicité sur des tapis de cellules confluentes. Nous avons ensuite démontré que la FB<sub>1</sub> inhibe la prolifération des cellules épithéliales porcines en induisant un blocage du processus de réplication cellulaire. La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale s'établissant de part et d'autre d'une mono-couche cellulaire est un bon indicateur de l'intégrité de cette dernière. Nous avons montré que la FB<sub>1</sub> diminue, de façon dose dépendante, la résistance trans-épithéliale d'une mono-couche de cellules. Cet effet qui n'apparaît qu'après une exposition longue à la toxine (8-12 jours), est indépendant de l'état de différenciation des cellules et est partiellement réversible. Ces résultats suggèrent que l'ingestion d'aliments contaminés par la FB<sub>1</sub> pourrait diminuer le renouvellement des cellules épithéliales et altérer la fonction de barrière de cet épithélium.

### Effects of Fumonisin B<sub>1</sub>, a mycotoxin associated to maize, on porcine epithelial intestinal cells.

Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) is the mycotoxin the most frequently encountered throughout the world. It is produced by *Fusarium verticillioides*, a fungus that commonly contaminates maize. FB<sub>1</sub> causes various pathologies in domestic animals including pigs. As the gastrointestinal epithelium is the first tissue exposed to the toxin, we analyzed the effects of FB<sub>1</sub> on a porcine intestinal epithelial cell line, the IPEC-1 cells. First, we studied the cellular lysis (cytotoxicity) caused by increasing doses of FB<sub>1</sub>. We showed that doses below 50 µM of FB<sub>1</sub> do not induce cytotoxicity on dividing cells and we had to increase concentrations to 700 µM to induce toxicity on monolayers formed by confluent cells. We then demonstrated that FB<sub>1</sub> inhibits epithelial intestinal porcine cell proliferation by blocking the cellular replication process. The measure of the trans-epithelial electrical resistance established between a cellular monolayer is a good indicator for the maintenance of its integrity. We showed that FB<sub>1</sub> decreases trans-epithelial resistance of cell monolayer, in a dose-dependent manner. This effect appears only after a long exposure to the toxin (8-12 days), is independent of the differentiation status of the cells and is partially reversible. Our results suggest that FB<sub>1</sub> contaminated food ingestion could diminish the epithelial cell renewal and alter the barrier function of the epithelium.

## INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires fongiques susceptibles de contaminer l'alimentation animale et humaine à tous les stades de la chaîne alimentaire. Parmi les mycotoxines, la fumonisine B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) 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).

Chez les animaux de rente, la fumonisine provoque des affections variées, deux formes d'évolutions fatales étant plus particulièrement caractérisées : la leucoencéphalomalacie 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 cancers de l'oesophage (YOSHIZAWA et al. 1994).

Bien que la découverte de la structure de la FB<sub>1</sub> 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 leurs métabolites) et une déplétion en céramide et en sphingolipides complexes. Cette rupture de métabolisme provoque de nombreux bouleversements biochimiques (RILEY et al., 1998).

L'épithélium du tractus gastro-intestinal représente la première barrière de l'organisme contre les molécules chimiques ingérées et les contaminants alimentaires comme les toxines et les bactéries. Après l'ingestion d'une nourriture contaminée par les mycotoxines, les cellules épithéliales intestinales peuvent être exposées à de fortes concentrations de toxine (PRELUSKY et al., 1996 ; SHEPHARD et al., 1996). Il était donc intéressant d'analyser les effets toxiques des fumonisines sur l'intestin (ENONGENE et al., 2002) et les cellules épithéliales intestinales (STEVENS et TANG, 1997 ; SCHMELZ et al., 1998).

Le but de ce travail était d'analyser les effets toxiques de la FB<sub>1</sub> sur un modèle de cellules épithéliales intestinales de porclet, la lignée IPEC-1, cellules capables de se différencier afin de mimer un épithélium intestinal. Nous avons alors étudié l'effet de FB<sub>1</sub> sur la prolifération cellulaire et sur l'intégrité cellulaire en mesurant la résistance électrique trans-épithéliale.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Culture cellulaire et toxine

La lignée cellulaire IPEC-1 est une lignée de cellules épithéliales intestinales dérivées du petit intestin d'un Mini-Porc New Hampshire nouveau-né (GONZALEZ-VALLINA et al., 1996). Cette lignée cellulaire nous a été généreusement four-

nie par les D<sup>rs</sup> H.M. BERSCHNEIDER et D.D. BLACK. Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère saturée en eau, à 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37°C. Le milieu de culture complet est du DMEM/F12 (Eurobio, les Ulis, France) complété avec 5 % de sérum de veau foetal, 2 mM de L-glutamine, du cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine ; Eurobio), 15 mM d'Hépès (Eurobio), de l'épidermal growth factor (5 µg/L ; Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, France) et de l'ITS (mélange d'insuline, transférine et sélénium ; Sigma, St Quentin Fallavier, France).

La Fumonisine B<sub>1</sub> (Promec, Tygerberg, Afrique du Sud) a été dissoute à 10 mM dans de l'eau et stockée à 4°C. Les différentes concentrations utilisées pour les cultures cellulaires ont été réalisées dans du DMEM/F12 complet.

### 1.2. Test de lyse cellulaire – Détermination de la cytotoxicité

La cytotoxicité de la FB<sub>1</sub> a été évaluée sur les cellules épithéliales intestinales porcines en mesurant la libération de l'enzyme cytoplasmique Lactate Déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture. La libération de la LDH se corrèle avec le nombre de cellules lysées et est très utilisée pour des études de cytotoxicité (TIPTON et al., 2003). Le dosage a été réalisé grâce au kit CytoTox 96<sup>®</sup> Assay Kit suivant les indications du fournisseur (Promega, Charbonnières, France). Brièvement, les cellules épithéliales intestinales porcines ont étéensemencées dans des plaques 96-puits à la concentration de 1 x 10<sup>4</sup> et 2,5 x 10<sup>4</sup> cellules/puits pour étudier, respectivement, la cytotoxicité de la FB<sub>1</sub> sur des cellules en division et des cellules confluentes, ne se divisant plus. Après une nuit à 37°C, le milieu a été remplacé par du milieu complet contenant différentes concentrations de FB<sub>1</sub>. L'activité de la LDH a été mesurée 48 heures plus tard sur 50 µL de surnageant des cellules. L'absorbance (D.O. expérimentale) a été mesurée à 492 nm sur un lecteur de plaques ELISA (Tecan, Trappes, France). Le taux maximal de libération de LDH (D.O. de la lyse totale) a été obtenu après avoir lysé la totalité du tapis cellulaire avec 0,08 % de Triton X-100. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la lyse totale, correspondent à [(D.O. expérimentale – D.O. du milieu sans cellule)/(D.O. de la lyse totale – D.O. valeur du milieu sans cellule) x 100].

### 1.3. Test de prolifération cellulaire - test MTS

L'effet de la FB<sub>1</sub> sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales porcines a été étudié par un test colorimétrique grâce au kit CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega). Les cellules épithéliales intestinales porcines ont étéensemencées à la concentration de 3 x 10<sup>3</sup> cellules/puits dans 100 µL de milieu complet dans des plaques 96-puits. Après 24 heures, des concentrations croissantes de FB<sub>1</sub> comprises entre 10 et 200 µL ont été ajoutées aux cellules. Après 48 heures d'incubation, 20 µL d'une solution fraîchement préparée de MTS/PMS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium/ phénazine méthosulfate) ont été ajoutés sur les cellules. Une nouvelle étape d'incubation a été réalisée pour 2 à 4 heures. La quantité de formazan soluble produite par réduction cellulaire du MTS a été déterminée par

mesure de l'absorbance à 492 nm sur un lecteur de plaques ELISA.

#### 1.4. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux

L'analyse du contenu cellulaire en ADN a été réalisée par cytométrie de flux. Pour cette analyse,  $0,75 \times 10^5$  cellules épithéliales intestinales porcines ont étéensemencées dans du milieu complet. Après 24 heures de culture dans des plaques 6-puits (Polylabo-Nunc), les cellules ont été traitées avec des concentrations de FB<sub>1</sub> allant de 5  $\mu\text{M}$  à 100  $\mu\text{M}$ . Quarante huit heures plus tard, les cellules ont été trypsinées et les suspensions cellulaires ont été fixées pour 45 minutes dans une solution d'éthanol à 70 %. Les cellules ont ensuite été colorées pendant 30 minutes, à température ambiante, avec une solution de PBS contenant 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNaseA (Sigma) et 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'iodure de propidium (Sigma). L'analyse du contenu cellulaire et en particulier la détermination du nombre de cellules bloquées en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire a été réalisée à l'aide d'un analyseur Facscan (Becton Dickinson Labware) et du logiciel CELL-QUEST™.

#### 1.5. Mesure de la résistance électrique trans-épithéliale

Les cellules épithéliales intestinales porcines ont étéensemencées dans du milieu complet sur des filtres Tranwells poreux (porosité de 0,4  $\mu\text{m}$  ; Becton-Dickinson Labware). Après s'être assuré de la confluence des cellules, les compartiments apicaux et basaux ont été remplis avec du milieu complet DMEM/F12 ne contenant plus de sérum mais contenant de la dexaméthasone (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma) pour permettre la différenciation des cellules. Le traitement par la FB<sub>1</sub> (0, 50, 200 et 500  $\mu\text{M}$ ) a commencé soit au début du processus de différenciation (quand les cellules sont confluentes avant l'addition de dexaméthasone) ou à la fin du processus de différenciation (quand les cellules sont totalement différenciées, 10 jours après le début de l'addition de dexaméthasone). L'intégrité des jonctions étanches est évaluée par la mesure de la résistance trans-épithéliale en utilisant un Volt-Ohm-mètre Millicell (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). Les valeurs expérimentales de résistance trans-épithéliale sont exprimées en kohms  $\times$  cm<sup>2</sup>.

#### 1.6. Analyses statistiques

Un test non paramétrique, le test U de Mann-Whitney, a été utilisé pour déterminer les différences induites par la FB<sub>1</sub> sur la cytotoxicité, la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et la résistance trans-épithéliale. Les valeurs de probabilité P inférieures à 5 % ont été considérées comme significatives et ont été symbolisées par l'ajout d'une étoile (\*) sur les figures concernées.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Effets cytotoxiques de la FB<sub>1</sub> sur des cellules épithéliales intestinales porcines

Les cellules épithéliales intestinales porcines ont été cultivées pendant 2 jours en présence de différentes concentrations de

FB<sub>1</sub> et l'effet cytotoxique de la mycotoxine a été évalué par mesure de la libération de LDH. Comme le montre la figure 1, la FB<sub>1</sub> n'induit pas de lyse cellulaire sur des cellules se divisant, quand on utilise des concentrations allant de 2 à 20  $\mu\text{M}$ . A plus fortes concentrations (50  $\mu\text{M}$  et au delà), l'effet cytotoxique observé est proportionnel à la dose de FB<sub>1</sub> ajoutée au milieu de culture. Sur des cellules confluentes (figure 2), la FB<sub>1</sub> n'induit aucune libération de LDH, excepté pour la plus forte concentration de toxine utilisée (700  $\mu\text{M}$ ).

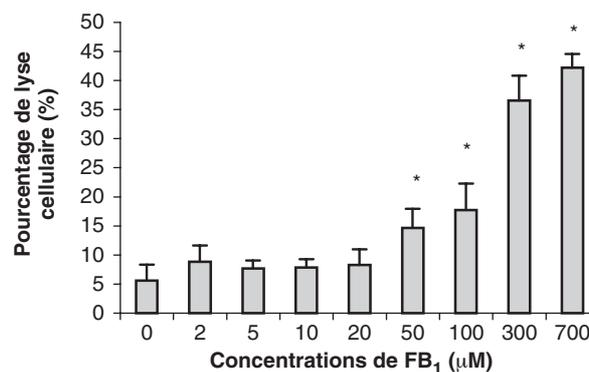


Figure 1 - Etude de la cytotoxicité de la FB<sub>1</sub> sur des cellules en division

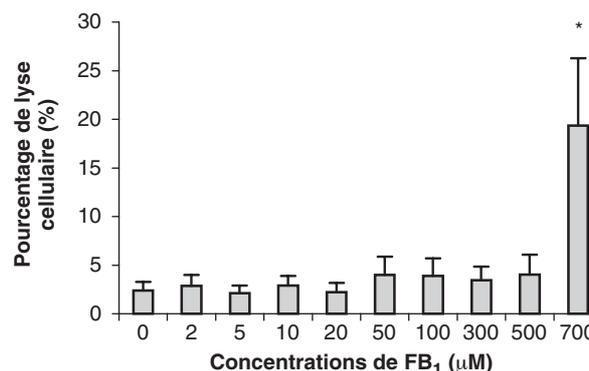


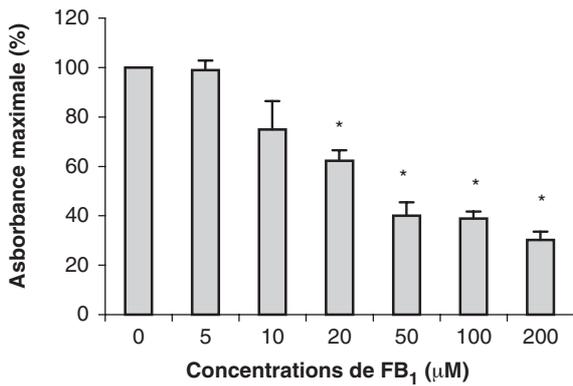
Figure 2 - Etude de la cytotoxicité de la FB<sub>1</sub> sur des cellules confluentes

### 2.2 Effet de la FB<sub>1</sub> sur la croissance cellulaire des cellules épithéliales intestinales porcines

Pour des concentrations de FB<sub>1</sub> ne présentant pas de cytotoxicité, nous avons analysé si la toxine avait un effet sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Ceci a été réalisé en déterminant le nombre de cellules métaboliquement actives par une méthode colorimétrique (test MTS). Les résultats, présentés dans la figure 3, montrent que la FB<sub>1</sub> diminue le nombre de cellules de façon dépendante de la dose. L'effet de la FB<sub>1</sub> est visible ( $p < 0,05$ ) dès 20  $\mu\text{M}$ .

### 2.3. Effet de la FB<sub>1</sub> sur le cycle cellulaire des cellules épithéliales porcines

Après avoir montré que la fumonisine B<sub>1</sub> inhibait la prolifération cellulaire, nous avons cherché à déterminer à quel niveau du cycle cellulaire cette toxine agissait. Le pourcenta-



**Figure 3** - Effet de la FB<sub>1</sub> sur la prolifération des cellules épithéliales porcines

ge de cellules épithéliales intestinales porcines, dans les différentes phases du cycle cellulaire, a été déterminé par cytométrie de flux. Pour cela, les cellules ont été traitées pendant 48 heures avec des concentrations croissantes de FB<sub>1</sub> (5 à 200 µM) et leur contenu en ADN a été analysé après incorporation d'une molécule intercalante et fluorescente, l'iodure de propidium.

Comme le montre le tableau 1, le traitement par la FB<sub>1</sub> bloque la réplication cellulaire en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle, proportionnellement à la concentration de toxine utilisée. En effet, 64,3 % des cellules IPEC-1 non traitées sont en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> alors qu'après un traitement de 48 heures avec 200 µM de FB<sub>1</sub>, ce pourcentage augmente à 80,4 %.

**Tableau 1** - Effet de la FB<sub>1</sub> sur la répartition des cellules en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire

Traitement	Pourcentage de cellules en phase G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)
Contrôle	64,3 ± 3,2
5 µM FB <sub>1</sub>	76,9 ± 5,6 *
20 µM FB <sub>1</sub>	77,7 ± 2,4 *
100 µM FB <sub>1</sub>	78,8 ± 6,3 *
200 µM FB <sub>1</sub>	80,4 ± 4,3 *

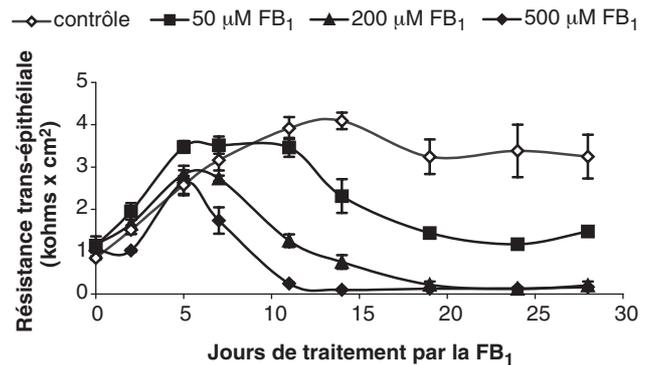
#### 2.4. Effet de la FB<sub>1</sub> sur la résistance trans-épithéliale des cellules

Les effets de la toxine ont également été étudiés sur le développement et la maintenance de la résistance électrique trans-épithéliale, un bon indicateur de l'intégrité de la monocouche de cellules cultivées sur des filtres poreux.

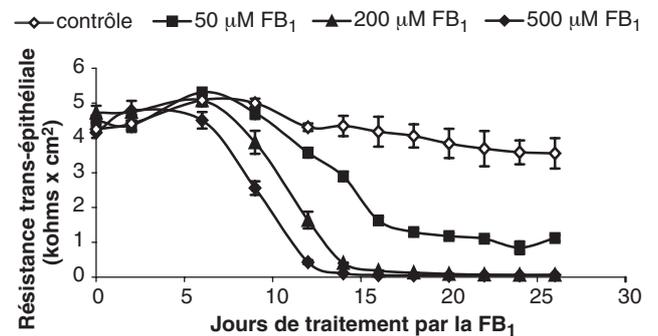
Les cellules ont été traitées alors qu'elles étaient à confluence mais non différenciées (figure 4) ou lorsqu'elles étaient pleinement différenciées (figure 5). Le traitement s'est poursuivi pendant toute la durée de l'expérience et les mesures électrophysiologiques ont été réalisées à intervalles réguliers pendant un mois. Nos résultats montrent que la FB<sub>1</sub> perturbe l'intégrité de la monocouche de cellules épithéliales intestinales, indépendamment de l'état de différenciation de ces cellules. Cet effet

est proportionnel à la dose utilisée et au temps d'interaction avec la toxine. Par ailleurs, le développement et le maintien des valeurs de la résistance trans-épithéliale n'ont pas été affectés pendant les 5 premiers jours de traitement, quelles que soient les concentrations de FB<sub>1</sub> étudiées. Enfin, 15 à 18 jours ont été nécessaires pour observer une complète abolition de la résistance trans-épithéliale, même pour de fortes concentrations de toxine (200 et 500 µM).

Par contre, en présence de faible concentration de FB<sub>1</sub> (50 µM), il faut attendre 13 jours pour observer une diminution de la résistance trans-épithéliale et celle-ci n'est jamais totalement abolie même après 26 à 28 jours de traitement.



**Figure 4** - Effet de la FB<sub>1</sub> sur la résistance trans-épithéliale de cellules en cours de différenciation



**Figure 5** - Effet de la FB<sub>1</sub> sur la résistance trans-épithéliale de cellules totalement différenciées

### 3. DISCUSSION - CONCLUSION

L'épithélium digestif des animaux consommant des nourritures à base de maïs de mauvaise qualité peut être exposé à de fortes concentrations de fumonisines. Les porcs, dont l'aliment essentiel est le maïs dans certaines régions, sont naturellement exposés à ces toxines. La FB<sub>1</sub> est faiblement absorbée (SHIER et al., 2000) et chez les porcs, sa biodisponibilité est de seulement 4 %, après une administration intragastrique (PRELUSKY et al., 1994). Aussi, les cellules épithéliales intestinales peuvent être en contact avec de fortes quantités de FB<sub>1</sub>. En effet, SHEPHARD et al. (1995) ont démontré que 24 heures après l'administration de FB<sub>1</sub> radio-marquée, les cellules épithéliales intestinales de primates contenaient 25 % de la dose administrée. NORRED et al. (1993) ont également montré que 80 % de la FB<sub>1</sub> radio-marquée administrée

à des rats était excrétée dans les fécès en 48 heures. La principale voie d'élimination de la FB<sub>1</sub> se fait via la bile (NORRED et al., 1993 ; SHEPHARD et al., 1995) et la circulation entéro-hépatique augmente probablement encore l'exposition des cellules intestinales à la mycotoxine.

Dans notre étude, certains effets causés par la FB<sub>1</sub> (comme la diminution de la résistance trans-épithéliale) ont été observés seulement après une longue exposition à la toxine (10 - 15 jours). Cette longue exposition peut naturellement se produire car les animaux consomment souvent le même lot de nourriture pendant une longue période.

Plusieurs études ont montré une faible absorption de la FB<sub>1</sub> dans l'intestin (VUDATHALA et al., 1994 ; PRELUSKY et al., 1995). Cependant, toutes ces études ont été réalisées avec une administration unique de FB<sub>1</sub>. Nos résultats *in vitro* indiquent qu'une exposition chronique à la toxine diminue la résistance trans-épithéliale de mono-couches de cellules intestinales. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse qu'une exposition chronique à la FB<sub>1</sub> augmente la perméabilité membranaire et ainsi puisse conduire à une augmentation de l'absorption de la FB<sub>1</sub>. Aussi, des animaux exposés de façon chronique à la toxine pourraient présenter une plus forte absorption de la FB<sub>1</sub>, ce qui pourrait contribuer à une plus forte sensibilité systémique de ces animaux.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un effet délétère de la FB<sub>1</sub> à la fois sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales porcines ainsi que sur leur capacité à développer ou à maintenir un épithélium, barrière protégeant l'organisme contre des produits chimiques ingérés dans la

nourriture, mais également contre des microorganismes pathogènes. Une des conséquences de cette perturbation de la barrière intestinale par la FB<sub>1</sub> pourrait être une translocation augmentée des bactéries pathogènes à travers l'intestin. Cette hypothèse est en accord avec de récents résultats obtenus dans notre laboratoire chez des porcelets contaminés par la FB<sub>1</sub> (OSWALD et al., 2003). En effet, nous avons montré que l'administration orale de FB<sub>1</sub> pendant 7 jours à des porcelets augmente significativement la colonisation de leur petit et gros intestin par des bactéries pathogènes et augmente également la translocation bactérienne à des organes extra-intestinaux.

En conclusion, nos résultats indiquent que la FB<sub>1</sub> présente des effets toxiques sur les cellules différenciées comme indifférenciées. Elle diminue la croissance de cellules en division en les bloquant en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle cellulaire. La FB<sub>1</sub> perturbe également l'établissement d'une barrière épithéliale et détruit celle qui est déjà établie. Ces données indiquent qu'une consommation chronique d'aliments contaminés par la FB<sub>1</sub> provoque des dommages au niveau intestinal et pourrait ainsi avoir des répercussions sur la santé animale.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions les D<sup>rs</sup> Helen M. BERSCHNEIDER et Denis D. BLACK pour leur aimable don de cellules IPEC-1. Sandrine BOUHET est titulaire d'une bourse du Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. Ce travail a été en partie financé par Région Midi-Pyrénées, France (DAER-Rech/99008345) et par le projet Transversalité INRA (Mycotoxines-P00263).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BENZUIDENHOUT S.C., GELDERBLUM W.C.A., GORST-ALLEMAN C.P., 1988. J. Chem. Soc. Chem. Com., 11, 743-745.
- DUTTON M. F., 1996. Pharmacol. Ther., 70, 137-161.
- ENONGENE E.N., SHARMA R.P., BHANDARI N., MILLER J.D., MEREDITH F.I., VOSS K.A., RILEY R.T., 2002. Toxicol. Sci., 67, 173-181.
- GONZALEZ-VALLINA R., WANG H., ZHAN R., BERSCHNEIDER H.M., LEE R.M., DAVIDSON N.O., BLACK D.D., 1996. Am. J. Physiol., 271, 249-259.
- LE BARS J, LE BARS P., DUPUY J., BOUDRA H., 1994. J. A.O.A.C. Int., 77, 517-521.
- MERRILL JR, A.H., SCHMELZ E. M., DILLEHAY D.L., SPIEGEL S., SHAYMAN J.A., SCHROEDER J. J., RILEY R. T., VOSS K. A., WANG E., 1997. Toxicol. Appl. Pharmacol., 142, 208-225.
- NORRED W.P., 1993. J. Toxicol. Env. Health., 38, 309-328.
- OSWALD I.P., DESAUTELS C., LAFFITTE J., FOURNOUT S., PERES S.Y., ODIN M., LE BARS P., LE BARS J., FAIRBROTHER J.M., 2003. Appl. Environ. Microbiol., 69, 5870-5874.
- PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., SAVARD M.E., 1994. Nat. Toxins, 2, 73-80.
- PRELUSKY D.B., SAVARD M.E., TRENHOLM H.L., 1995. Nat. Toxins, 3, 389-394.
- PRELUSKY D.B., TRENHOLM H.L., ROTTER B.A., MILLER J.D., SAVARD M.E., YEUNG J.M., SCOTT P.M., 1996. Adv. Exp. Med. Biol., 392, 265-2.
- RILEY R.T., VOSS K.A., NORRED W.P., SHARMA R.P., WANG E., MERRILL A.H., 1998. Revue Méd. Vét., 149, 617-626.
- SCHMELZ E.M., DOMBRINK-KURTZMAN M.A., ROBERTS P.C., KOZUTSUMI Y., KAWASAKI T., MERRILL A.H.JR., 1998. Toxicol. Appl. Pharmacol., 148, 252-260.
- SCOTT P., 1993. Int. J. Food. Microbiol., 18, 257-270.
- SHEPHARD G.S., THIEL P.G., SYDENHAM E.W., SAVARD M.E., 1995. Nat. Toxins, 3, 145-150.
- SHEPHARD G.S., THIEL P.G., STOCKENSTROM S., SYDENHAM E.W., 1996. J. A.O.A.C. Int., 79, 671-87.
- SHIER W.T., 2000. J. Toxicol., 19, 161-187.
- STEVENS V.L., TANG J., 1997. J. Biol. Chem., 272, 18020-18025.
- THIBAUT N., BURGAT V., GUERRE P., 1997. Rev. Med. Vét., 148, 369-388.
- TIPTON D.A., LYLE B., BABICH H., DABBOUS M.KH., 2003. Toxicol. In Vitro, 17, 301-310.
- VUDATHALA D.K., PRELUSKY D.B., AYROUD M., TRENHOLM H.L., MILLER J.D., 1994. Nat. Toxins, 2, 81-88.
- YOSHIZA T., YAMASHITA A., LUO Y., 1994. Appl. Environ. Microbiol., 60, 1626-1629.

