

Projet ISNATOX

Production de standards internes de toxines d'origine naturelle uniformément enrichis par des isotopes stables.

Marcel DELAFORGE, CEA Saclay, iBiTec-S SB2SM, URA2096 CNRS, 91191 Gif sur Yvette cedex, marcel.delaforge@cea.fr

Michel PEAN, CEA Cadarache, IBEB SDEV M GRAP13108 St Paul lez Durance cedex, michel.pean@cea.fr

Olivier PUEL, INRA Toulouse, UR 66 Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, 180 chemin de Tournefeuille 31931 Toulouse cedex 9, opuel@toulouse.inra.fr

Le dosage précis de composés exogènes toxiques ou non au sein d'organismes, dans l'alimentation ou l'environnement, nécessite l'utilisation de composés de référence et/ou de standards internes (SI). Les méthodes les plus sensibles de détection aujourd'hui utilisent le couplage HPLC-MSn. Pour détecter le composé recherché, souvent hautement dilué dans des matrices complexes, le SI doit mimer au mieux le comportement physico-chimique du composé à quantifier (partition entre les phases en milieu hétérogène, caractéristiques spectroscopiques etc.), donc être de structure la plus proche possible, et en outre de donner un signal spécifique à faible concentration. Une solution efficace consiste à prendre comme SI la molécule recherchée elle-même, mais marquée par des isotopes naturellement peu abondants. Le marquage radioactif est une possibilité, mais pose des problèmes de manipulation, d'éthique et de déchets. Dans le cadre du programme de recherche "AFSSET environnement et santé 2002", nous avons développé une méthode basée sur l'incorporation d'isotopes stables, au travers de l'exemple de la biosynthèse de mycotoxines uniformément enrichies en carbone ^{13}C (10% de ^{13}C). Cette méthode repose sur la culture sous atmosphère enrichie en ^{13}C CO_2 (10 %) de l'organisme-hôte (plante) sur lequel l'organisme fongique producteur de la mycotoxine se développe ensuite, produisant le composé souhaité (figure 1). Pour des raisons de chevauchement du signal obtenu en spectrométrie de masse, ces composés enrichis à 10% ^{13}C ne sont pas directement utilisables pour les mesures quantitatives.

Afin de démontrer la faisabilité et la pertinence de cette approche dans le cadre d'études réglementaires, de contrôles alimentaires ou environnementaux, nous souhaitons produire des SI contenant moins de 0.01% de composé entièrement ^{12}C , donc plus nettement différenciés sur l'analyse de masse. Dans ces conditions, les SI pourront être utilisés dans des matrices complexes tout en simplifiant les étapes de validation des procédures d'extraction et quantification. Cette technique d'analyse sera directement applicable à la détermination de seuils d'exposition et de dosage de contaminants dans les aliments ou l'environnement.

Compte tenu du coût de production des SI marqués et de leurs précurseurs dans les conditions d'enrichissement à 50 ou 100%, nous nous sommes focalisés sur la production de la zéaralénone, produite par *Fusarium graminearum* et actuellement recherchée dans les céréales, les aliments du bétail ainsi que dans les viandes. La durée du programme de deux ans prenait en compte la durée des cultures de céréales, durée qui est incompressible.

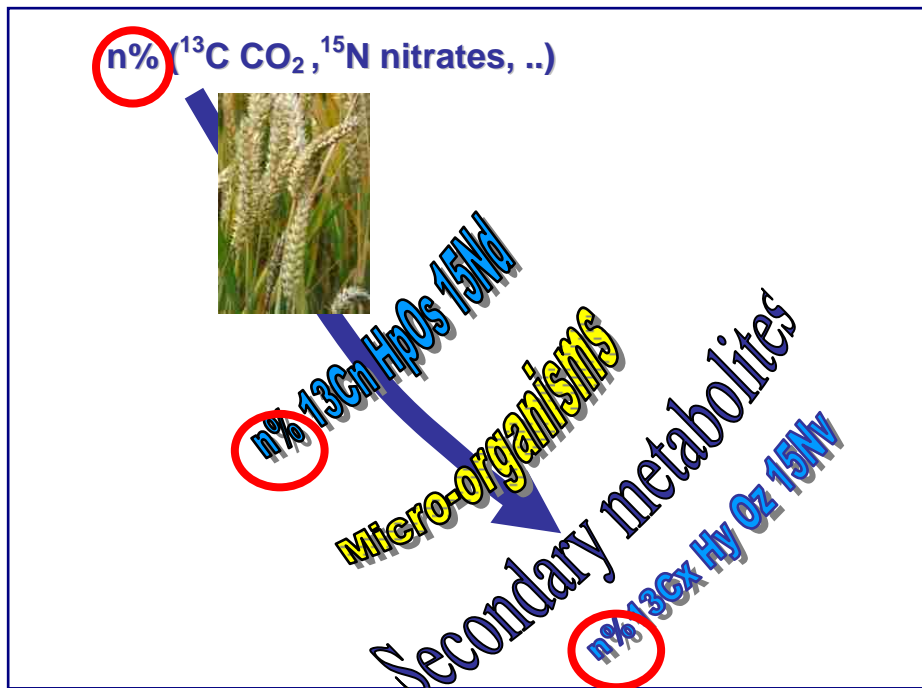


Figure 1 : méthodologie globale : du n%¹³C CO₂ aux molécules organiques n%¹³C.

1) Production de Biomasse végétale enrichie aux isotopes Stables (CEA Cadarache, équipe 2)

- Production de blé et de maïs enrichis en carbone 13 :

Nous avons choisi de travailler sur un blé tendre d'hiver (*Triticum aestivum*), variété Cap Horn. Les critères qui ont conduit à ce choix ont été les suivants :

- variété représentative des cultures actuelles en France (seconde variété cultivée en France en 2006),
- exigence en vernalisation et précocité (peu exigeante et demi-précoce),
- sensibilité à la fusariose (fortement sensible).

Enrichissement isotopique avec du ¹³C CO₂ à forte teneur.

L'objectif de ces cultures étant de produire des grains fortement enrichis en carbone 13 (environ 50 et 90%) nous avons décidé de ne commencer l'apport de l'isotope qu'au moment de la floraison, afin de minimiser la quantité et donc le coût de carbone 13 apporté. Dans ces conditions obtenir un très fort taux d'enrichissement (moins de 0.01% de composés 100% ¹³C), suppose que le remplissage des grains de blé après floraison nécessite peu de remobilisation de matière organique en provenance des parties végétatives synthétisées avant floraison (matière non enrichie). Le CO₂ enrichi en carbone 13 (50 et 99%) est apporté en continue pendant la période diurne (photosynthèse active). Chaque jour, avant le début de la période diurne, la teneur en carbone 13 du CO₂ contenu dans la chambre est automatiquement réajustée par piégeage à sa valeur nominale de 50 ou 99%, pour éliminer le ¹²CO₂ produit par la respiration nocturne (la majeure partie de la plante ayant été synthétisée avant l'apport de ¹³CO₂ dégage du ¹²CO₂ par sa respiration). Les paramètres essentiels du développement physiologique des plantes : photosynthèse nette, respiration nocturne et transpiration ainsi que les paramètres environnementaux sont suivis en continu pendant la totalité de la culture. La récolte a lieu 6 mois après la germination des plantules. Les productions théoriques de biomasse sont calculées à partir de ces vitesses de fixation (photosynthèses nettes) et de respiration nocturne. Elles permettent un suivi précis des consommations de CO₂ enrichi en carbone 13. Connaissant le déroulement théorique d'un cycle de culture on peut ainsi estimer précocement les quantités d'isotopes qui seront nécessaires.

Les quantités de grains et leur enrichissement réels sont reportés tableau 1. Ces enrichissements sont inférieurs à ceux attendus (respectivement 75% pour 99% attendu et 38% pour 50% attendu). Contrairement à notre hypothèse de départ, une part importante du carbone (24% dans les deux cas) constitutif des grains provient de remobilisation, c'est à dire de carbone fixé par les plantes préalablement à la floraison (début de l'apport en carbone 13

Afin d'obtenir un niveau d'enrichissement maximal en ^{13}C , une nouvelle culture a été initiée. Pour cette production il a été décidé d'apporter le CO_2 enrichi en carbone 13 à 99% dès l'apparition des premières feuilles et jusqu'à complet remplissage des grains. Les autres paramètres de culture sont identiques aux deux précédentes. La quantité de grains récoltés au bout de six mois environ et leur enrichissement réels sont reportés dans le tableau 1.

Pour le maïs (*Zea mays*) nous avons choisi de travailler avec la variété Antares. Des cultures précédemment réalisées au laboratoire avaient montré la difficulté d'obtenir de bons rendements en grains dans nos chambres en raison de leurs trop petites tailles pour des plantes telles que le maïs. Par ailleurs des études préliminaires avaient montré la possibilité de produire des mycotoxines d'intérêt par des cultures de champignons utilisant des feuilles et des tiges de maïs comme seul substrat. Nous avons donc décidé de nous limiter à une production de parties végétatives pour cette production de biomasse de maïs enrichie en carbone 13. Cette culture a été menée pendant 40 jours. Les quantités de biomasse produite et leur niveau d'enrichissement sont présentés dans le tableau 1.

	Objectif	Production réelle
Cultures Blé	50 % ^{13}C à floraison	353 g 38.10% +/-0.20 (n =4) ^{13}C grains
	99% ^{13}C à floraison	320g 75.11% +/- 0.79 (n = 4) ^{13}C grains
Culture maïs	50% ^{13}C Totalité biomasse	174g parties aériennes 45.08 % +/- 0.04 (n = 12) ^{13}C feuilles 26 g racines
Culture blé	99 % ^{13}C Totalité culture	180 g 96.78 % +/- 0.15 (n = 2) ^{13}C grains

Tableau 1 : Production de biomasse végétale enrichie en isotope stable

2) Production et caractérisation des Mélanges de mycotoxines par culture de champignon sur biomasse enrichie en isotope stable (Equipes 1 et 3)

Notre objectif premier était de produire durant ce programme des quantités de l'ordre de 10 mg de zearalénone (*Fusarium graminearum*) et d'acide mycophénolique (*Penicillium brevicompactum*) enrichis au ^{13}C à des taux de 50 et 99%.

Cette production est utilisée pour :

- vérifier les rendements d'incorporation lors de la bioconversion (effets isotopiques),
- optimiser l'utilisation de la biomasse (grains, paille, rafles),
- préparer des composés purs ou en mélange utilisables comme standard interne
- fournir des composés pour réaliser des études cinétiques dans des systèmes modèles.

- **Production de toxines sur milieux classiques en mycologie, sur support solide (pailles et céréales) avec ou sans incorporation d'isotopes stables.**

Les souches utilisées lors de cette étude, ont été préalablement sélectionnées après culture sur les milieux usuels.

Production sur biomasse

Une première phase de mise au point essentiellement du à l'utilisation de nouveaux supports nutritifs visant à se rapprocher au plus de conditions naturelles. Les paramètres les plus sensibles sont la valeur d'activité en eau (a_w) ainsi que la température.

Des méthodes d'extraction et de fractionnement ont été développées afin d'obtenir des quantités substantielles de toxines à des pourcentages de pureté supérieur à 90%. Nous avons obtenu respectivement après purification, à partir de 30 g de grains de blé, 76% et 38% ^{13}C , 28 mg de 37% ^{13}C acide mycophénolique, 27 mg de 76 % ^{13}C acide mycophénolique ou 2,4 mg de 39%, 2,4 mg de 81% ^{13}C zéaralénone (Tableau 2).

Les essais de valorisation de la biomasse se sont révélés être infructueux, les quantités de mycotoxines formées représentant moins de 5% de celles obtenues à partir des graines.

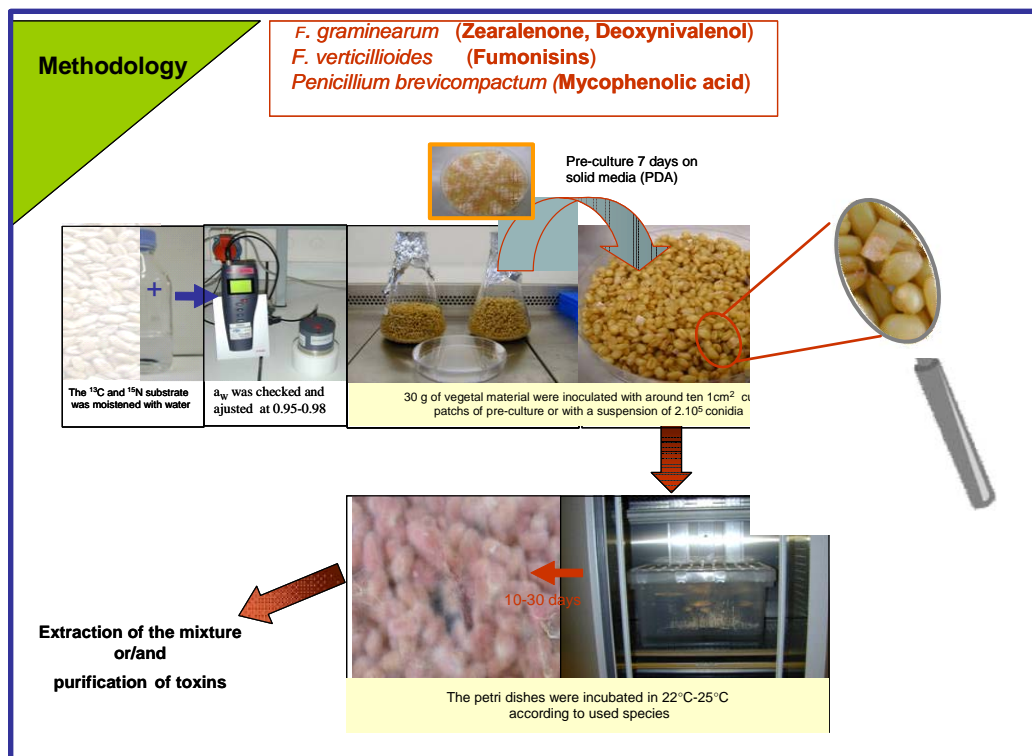


Figure 2 : Méthodologie suivie pour les productions de métabolites secondaires sur support solide

	Enrichissements		Quantité purifiée	Contribution à la masse nominale expérimentale (%)	Contribution à la masse nominale théorique (%)
	Biomasse	Mycotoxine			
Acide mycophénolique	37%	37%	28.1 mg	0	4.10^{-2}
	76%	76%	27.4 mg	0	5.10^{-9}
Zearalénone	37%	39%	2.4 mg	0	2.10^{-2}
	76%	81%	2.4 mg	0	10^{-11}

Tableau 2 : Production de métabolites secondaires réalisés dans le cadre de ce travail.

Enrichissement isotopique

Les taux d'enrichissement isotopique ont été déterminés à partir d'un algorithme développé par F Bravin dans le cadre de sa thèse en collaboration avec le groupe de biomathématique de l'Ecole centrale de Paris

Par comparaison des spectres théoriques à ceux obtenus par spectrométrie de masse il est possible de déduire la teneur exacte (à 1% près) de l'enrichissement. Ces analyses par masse sont répétées et la teneur est déterminée en plusieurs endroits du pic chromatographique. La différence de ces teneurs par rapport à celles du matériel organique initialement utilisé permet de conclure en l'existence ou non d'effet isotopique (différence d'utilisation de la molécule contenant l'isotope naturel le plus abondant (^{12}C) par rapport à la molécule artificiellement enrichie (^{13}C dans notre cas)). Aucun effet isotopique n'a été observé dans le cas de la production d'acide mycophénolique par *P.*

brevicompactum alors qu'un effet reproductible en faveur de l'utilisation du ^{13}C a été observé dans le cas de la production de zéaralénone par *F. graminearum*. Nous n'avons pu déterminer si cette différence de comportement provenait du champignon ou s'il était spécifique de la production de zéaralénone.

- **Extraction des toxines par partition de phase et fractionnement des différentes phases (organiques et aqueuses) et purification des métabolites.**

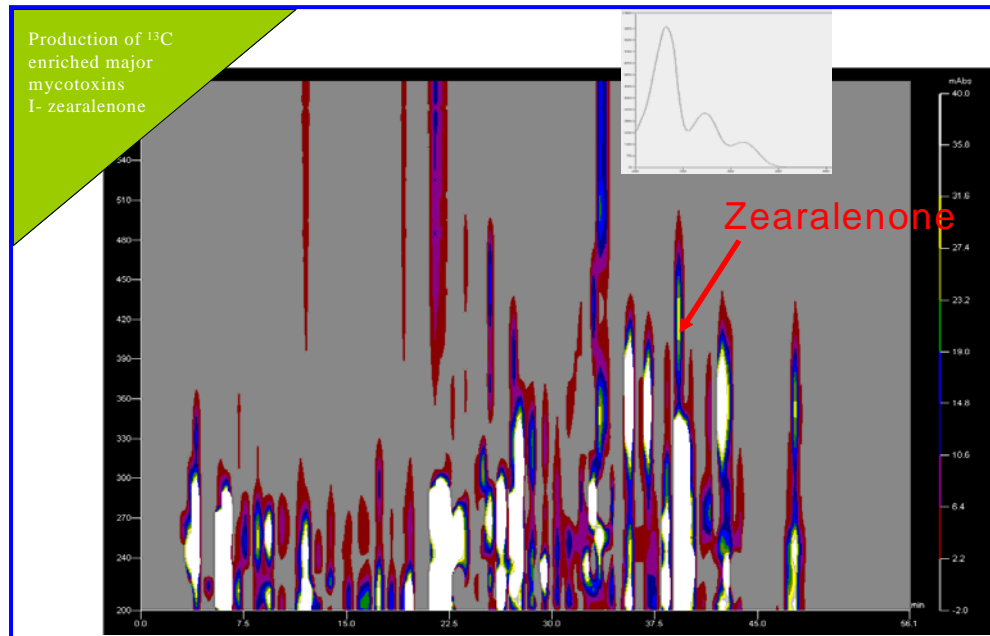


Figure 3 : Profil HPLC-UV d'une culture de *Fusarium graminearum* G5G7 après 30 jours de culture sur grains de blé enrichi par des isotopes stables

Un des grands intérêts de cette méthodologie de marquage réside dans l'enrichissement simultané de tous les métabolites secondaires produits par le champignon lors de la croissance sur le substrat enrichi. Il est donc envisageable de purifier plusieurs toxines marquées à partir d'une même culture. Les métabolites secondaires fongiques étant relativement stable dans le temps. Toutes les fractions qui n'ont pas d'intérêt de prime abord sont de nouveau regroupées, évaporées et conservées sous forme d'extrait sec en vue d'une éventuelle future application. A titre d'exemple les extraits de *P. brevicompactum* ont été conservés après extraction et purification de l'acide mycophénolique pour l'éventuelle purification de la Brevianamide A enrichie ^{13}C produite lors de la culture.

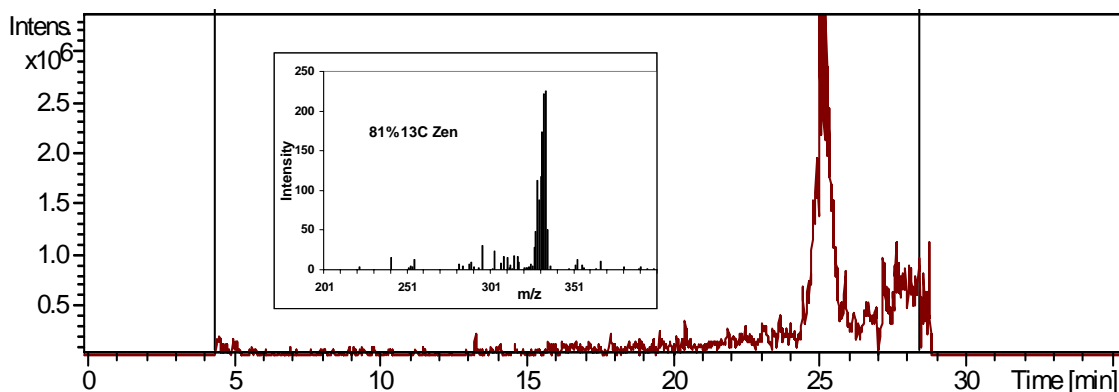


Figure 4 : Profil HPLC UV et spectre MS de ^{13}C zéaralénone extraite à partir d'une culture de *Fusarium graminearum* G5G7 après 30 jours de culture sur grains de blé enrichis à 79% de ^{13}C

Les quantités détectées dans l'extrait sont de l'ordre de 1 mg/ g de grain de blé mis en culture. Cependant les quantités récupérées après purification sont de l'ordre de 10%. Ces pertes étant dues à l'importante affinité de ce composé pour la verrerie utilisée lors de la purification.

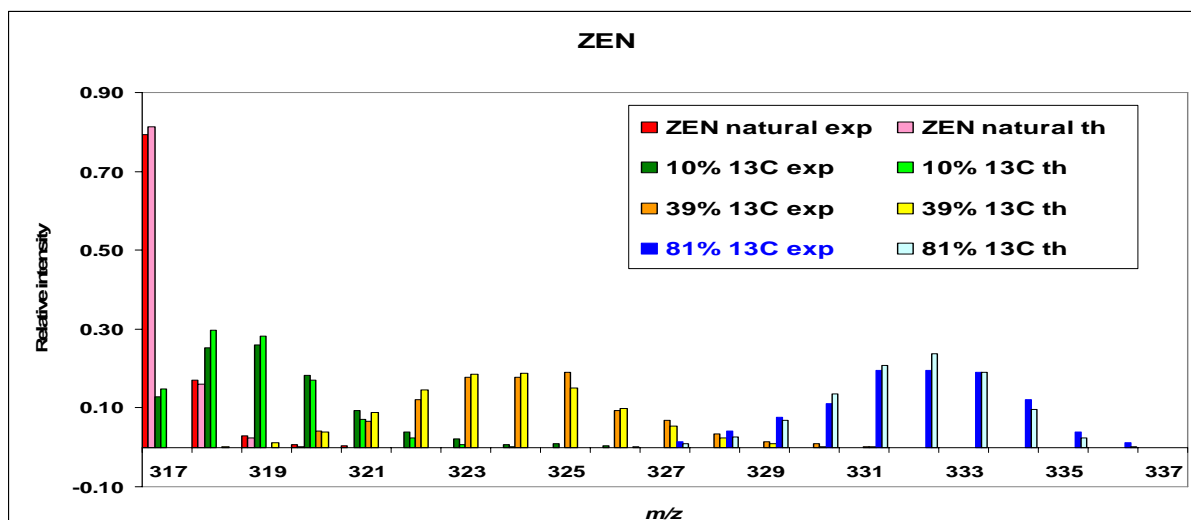


Figure 5 : Comparaisons des spectres de masse théoriques (th) et expérimentaux (exp) de la ZEN pour différents enrichissements au ^{13}C . Le taux déduit des calculs est pour la ZEN 37% de 39% \pm 1 et pour 75% de 80 \pm 1. Les différences d'intensité sont bien observables entre le calcul théorique (39 et 81%) et les spectres observés.

3) Utilisation comme standard interne

Les purifications et dosages des produits purifiés n'ont été finalisés que durant les dernières semaines du projet. Du fait de problèmes liés à la pureté de certains échantillons, les essais de mesures des différents taux d'enrichissement comme standard interne n'ont pu être menés à bien. Quelques essais ont été réalisés pour doser la zéralénone présente dans le plasma de rat et de poulet traités par ce composé (Thèse de R. Duca).

L'enrichissement isotopique a été utilisé afin de mener des dosages, le suivi ainsi que des études métaboliques dans des milieux biologiques humains ou dans des modèles animaux. Ainsi par exemple, le métabolite glucuronide de l'acide mycophénolique ^{13}C a été préparé et utilisé pour doser ce composé dans des plasmas de patients traités par cet immunomodulateur (Thèse de F. Bravin). De même la stérigmatocystine ^{13}C a été utilisée afin de connaître son devenir dans des cultures d'épithélium pulmonaire porcin (Thèse de Pharmacie de O. Cabaret, publication en cours de rédaction).

4) Collaborations internationales

Thèse en cotutelle, Roumanie

RC Duca a effectué d'octobre 2005 à Juin 2009 sa thèse en cotutelle entre l'université Paris XI et la faculté de Chimie de l'Université de Bucarest. Son thème de recherche concerne les « Effets d'aliments contaminés sur les enzymes de détoxification » et en particulier les mycotoxines.

Ce travail fait l'objet d'études complémentaires réalisées en France et en Roumanie et a abouti à un transfert de techniques et en particulier des méthodes analytiques utilisant les isotopes stables. L'ensemble des outils analytiques, biochimiques et enzymatiques que RC Duca utilise, permettront d'évaluer les niveaux de modifications des activités des enzymes de détoxification. Cette approche dédiée dans un premier temps aux contaminants fongiques pourra être appliquée aux denrées alimentaires mais aussi à l'évaluation des risques d'exposition de l'Homme ou des animaux aux composés présents dans notre environnement.

5) Publications

- M. Péan, S. Boiry, J-C. Ferrandi, F. Gibiat, O. Puel and M. Delaforge Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples. 1) Production of enriched biomass. *J Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2007, **50**:569-570.
- O. Puel, S. Tadrast, N. Loiseau, M. Pean and M. Delaforge Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples. 2) Production of mycotoxins and their characterization *J Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2007, **50**:563-564.
- F. Bravin, R.C. Duca, M. Pean, O. Puel and M. Delaforge Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples. 3) Tools for pharmacokinetics and as Internal standard *J Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 2007, **50**:537-538.
- F. Bravin, R.C. Duca, N. Loiseau, M. Pean, O. Puel and M. Delaforge. Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples. *World Mycotoxins J.* 2008, **1**:275-281.
- F. Bravin, R. C. Duca, P. Balaguer and M. Delaforge. *In vitro* Cytochrome P450 formation of mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, **10** :1824-1837.

6) Autres résultats

- **Liens avec les conventions ADEME et AFSSET 2006**

Ce projet accepté en décembre 2005 a été complété en janvier 2006 par un contrat AFSSET (convention ES-2005-012) et en février 2006 par un contrat ADEME (convention 0575C00309). Ces 2 projets consistent à démontrer l'utilisation de l'enrichissement isotopique dans des études de pharmaco- et toxico-cinétiques de mycotoxines aéroportées.

7) Valorisation

- Collaboration internationale : R Duca étudiant en thèse dans le cadre d'une cotutelle avec l'Université de Bucarest a participé à ce travail et a soutenu sa thèse en 2009.
- Session matinale "early morning session" Joint ISEE/ISEA International Conference on Environmental Epidemiology and Exposure, Paris 2-6 septembre 2006, conférence ouverte 1 heure "Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotope for their dosage in biological samples"
- F. Bravin a présenté sa thèse sur ce sujet à l'Ecole Centrale en décembre 2008.
- Participation de 3 personnes au XIIth International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins Istanbul 21-25 mai 2007. Communication orale de F. Bravin
- Participation de 2 personnes au VII^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Nantes 30 mai -1er Juin 2007 (O. Puel responsable d'une session de communications. Communication orale de F. Bravin
- Posters dans le cadre du 9th international symposium on the synthesis and applications of isotopes and isotopically labelled compounds. Edinburgh 16-20 juillet 2006

- **Commercialisation produits**

Lors de la mise en place du projet, le service « valorisation » du CEA Sciences de la vie a été consulté afin de connaître la brevetabilité de ce travail. Du fait du manque d'innovation dans les techniques mises en œuvre, nous n'avons pas déposé de brevet. Cependant une équipe Autrichienne a utilisé une approche analogue pour préparer des mycotoxines et les commercialiser courant 2007 (Sté Rohmer, Tulin, Autriche et Sté Sigma-Aldrich).

A titre de comparaison et pour faire une évaluation du coût, la Sté Sigma-Aldrich commercialise de la Fumonisine enrichie au Carbone 13 100% à plus de 10 000 €/mg. Dans nos conditions nous produisons environ 0.2 mg de fumonisine/g de maïs et plus de 1mg de zearalénone/g de blé. Avec le blé produit dans une culture à 100% de ¹³C (coût environ 20 000€ de 100% ¹³C CO₂) nous pourrions produire 100 mg de zearalenone 100% ¹³C. Ceci n'incluant pas la main d'œuvre et les frais d'infrastructure !

Points forts issus de ce travail

- Production possible de métabolites secondaires à des taux d'enrichissement élevés et contribuant à moins de 0.01% du signal de la masse nominale du composé en spectrométrie de masse ;

- Remobilisation lors de culture confinée de blé Cap Horn, ceci doit être vérifié en utilisant des matières azotées enrichies à l'azote 15 ;
- Production des mycotoxines en fonction de l'état végétatif ou de maturation de leur hôte ;
- Absence d'effet isotopique lors de la production fongique d'acide mycophénolique ;
- Préférence isotopique lors de la production fongique de zéaralénone ;
- Absence d'effet isotopique lors du métabolisme de la zéaralénone par les stéroïde-dehydrogénases ;
- Possibilité d'adaptation des méthodes analytiques en MSn pour la détection et le suivi des mycotoxines dans des matrices complexes ;
- Existence d'un marché potentiel pour ces standards internes ;
- Initiation de nouvelles études focalisées sur les effets de mélange de composés et de leurs effets sur les enzymes de détoxification des mammifères.

Savoir faire acquis et licenciable

1 Culture de végétaux sous atmosphère contrôlée durant tout le cycle végétatif (plusieurs mois), cultures hors-sol (support vermiculite et contrôle des apports de carbone, d'azote, O₂,...) ;

2 Suivi fin des conditions de cultures (température, hygrométrie, gaz, nutriments azotés, incorporation carbone, ...) ;

3 Culture de micro-organismes (champignons, bactéries) sur biomasse organique solide (grains, tige, papiers peints, ...) plusieurs centaines de souches disponibles ;

4 Caractérisation des souches et des micro-organismes produits ;

5 Caractérisation des mycotoxines et métabolites secondaires produits ;

6 Etudes métaboliques et de transport de ces composés dans des cellules animales, utilisation des systèmes acellulaires, cellulaires humains ou animaux.

Les points **1** et **2** correspondent aux techniques développées au CEA Cadarache (GRAP, M. Péan) ; les points **3-5** à celles de l'INRA Toulouse (O. Puel) et les points **5** et **6** au CEA Saclay (M. Delaforge). Cet ensemble travaille sur ce projet depuis maintenant près de 8 ans dans le cadre de projets ANR, AFSSET et ADEME.