



HAL
open science

ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DU TRANSPORT DE COMPOSÉS EXOGÈNES GRÂCE À L'ENRICHISSEMENT ISOTOPIQUE UNIFORME AU 13C.

Frédérique Bravin

► **To cite this version:**

Frédérique Bravin. ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DU TRANSPORT DE COMPOSÉS EXOGÈNES GRÂCE À L'ENRICHISSEMENT ISOTOPIQUE UNIFORME AU 13C.. Sciences pharmaceutiques. Ecole Centrale Paris, 2008. Français. NNT: . tel-00352986

HAL Id: tel-00352986

<https://theses.hal.science/tel-00352986>

Submitted on 14 Jan 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**ÉCOLE CENTRALE DES ARTS
ET MANUFACTURES
« ÉCOLE CENTRALE PARIS »**

THÈSE
présentée par

Frédérique BRAVIN

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR

Spécialité : Sciences de l'ingénieur

Laboratoire d'accueil : Mathématiques Appliquées aux Systèmes

**SUJET : ÉTUDE DU MÉTABOLISME ET DU TRANSPORT DE COMPOSÉS
EXOGENES GRÂCE À L'ENRICHISSEMENT ISOTOPIQUE UNIFORME AU ¹³C.**

soutenue le : mardi 9 décembre 2008

devant un jury composé de :

**Madame Sylvaine LECOEUR
Monsieur Richard ROBINS
Madame Françoise XAVIER
Monsieur Grégory GENESTE
Monsieur Pierre GALTIER
Monsieur Marcel DELAFORGE**

**Rapporteur
Rapporteur**

Directeur de thèse

2008-54

Résumé :

L'étude de nombreux composés exogènes (composés étrangers à l'organisme) ne pose pas de difficultés lorsqu'ils sont isolés, purifiés et en quantités suffisantes pour les seuils de détection des appareils de mesure usuels utilisés en biologie (Chromatographie, RMN, Spectrométrie de masse, etc.). Lorsqu'ils se retrouvent dans un fluide biologique (sang, urines, extraits d'organe...), ils sont souvent en quantités telles que l'effet matrice ou le bruit de fond des appareils rend leur détection et leur dosage très délicats. L'utilisation de standards internes marqués uniformément au carbone 13 et/ou à l'azote 15 permet d'obtenir un signal plus facilement reconnaissable et identifiable grâce à la présence des isotopes (pics de masse décalés, massifs isotopiques identifiables en spectrométrie de masse par exemple). C'est pourquoi, en complément des études analytiques et biochimiques du métabolisme de la zéaralénone (ZEN), nous nous sommes intéressés aux calculs prévisionnels de spectres de masse de molécules enrichies à des taux variables (entre 0 et 1) de différents isotopes (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O et ^2H). Parallèlement nous avons étudié l'influence d'un enrichissement au ^{13}C sur la réactivité d'une molécule donnée, d'un point de vue théorique et expérimental.

Mots-clés : métabolisme, zéaralénone, enrichissement isotopique uniforme, spectrométrie de masse, standard interne.

Abstract:

The study of many exogenous compounds does not raise difficulties when they are isolated, purified and in quantities sufficient for the usual detection methods used in biology (Chromatography, NMR, Mass Spectrometry, etc). When they are found in a biological fluid (blood, urines, ...), they are often in infinitesimal amount such as the effect of their biological matrices or the background noise that make their detection and their quantification very delicate. The use of internal standards uniformly enriched with carbon 13 and/or nitrogen 15 makes it possible to obtain a signal more easily recognizable and identifiable thanks to the presence of the isotopes (peaks shifted in a mass spectrum for example). This is why, complementary to the analytical and biochemical studies of zearalenone (ZEN) metabolism, we were interested in building mass spectra of molecules enriched (rates between 0 and 1) by various isotopes (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O and ^2H). In parallel we studied the influence of the ^{13}C enrichment on the reactivity of a given molecule, from a theoretical and an experimental point of view.

Key-words: metabolism, zearalenone, uniform isotopic enrichment, mass spectrometry, internal standard.

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Service de Bioénergétique, Biologie Structurale, et Mécanisme du Commissariat à l'Énergie Atomique de Saclay et au Laboratoire de Mathématiques Appliquées aux Systèmes de l'École Centrale Paris. Je tiens à en remercier leur deux directeurs respectifs, Bruno Robert et Christian Saguez, pour m'avoir accueillie au sein de leur unité.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur d'accepter de juger ce travail : Madame Sylvaine Lecoer, Chargée de Recherche à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon (Institut National de la Recherche Agronomique), Monsieur Richard Robins, Directeur de Recherche au Laboratoire d'Analyse Isotopiques et Electrochimique de Métabolismes de l'Université de Nantes (Centre National de la Recherche Scientifique) et Monsieur Pierre Galtier, Directeur de Recherche à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Toulouse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame Françoise Xavier, Directrice de Recherche et membre Émérite du Centre National de la Recherche Scientifique, pour avoir accepté de faire partie de ce jury, pour m'avoir accueillie dans l'équipe Malbio et pour avoir suivi mon travail tout au long de ces trois années avec enthousiasme et intérêt.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur Grégory Geneste, Enseignant chercheur au Laboratoire Structure Propriétés et Modélisation des Solides de l'École Centrale Paris, pour avoir accepté de faire partie de ce jury, pour m'avoir initiée à la modélisation ab initio, pour sa gentillesse et pour son aide permanente.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Marcel Delaforge, pour avoir dirigé ce travail, pour sa disponibilité ainsi que pour les discussions et réflexions que nous avons pu avoir. Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans son encadrement quotidien. Il m'a fait partager sa passion des mycotoxines et de la science en général. Ses connaissances, son expérience et son intérêt pour la recherche ont été pour moi une source de joies intellectuelles.

Un grand merci également à François André pour m'avoir accueillie dans son bureau et pour toutes nos discussions politico-scientifiques. Je remercie spécialement Radu Duca et tous les étudiants et post-doctorants qui ont travaillé dans l'équipe « P450 » et qui ont participé à la bonne humeur du labo: Sylvain, Tièn-An, Sandrine, Paola, Thibault et Jamel. Je remercie également Lionel Perrin pour sa relecture et ses précieuses remarques sur le manuscrit et Michel pour sa bonne humeur légendaire.

L'occasion m'est donnée de remercier tous les membres du SB2SM (et tous ceux de l'ex SBFM) que j'ai pu croiser dans les couloirs au cours de ces années. Une mention spéciale pour Pascale et sa formidable efficacité pour toute sorte de commandes.

Je voudrais remercier ici les personnes grâce à qui ces années ont été des moments agréables de vie et d'échange. Je remercie notamment Agnès, Anaëlle et Martin pour leurs encouragements stimulants et pour avoir toujours manifesté leur intérêt pour le monde des mycotoxines et des isotopes stables. Un grand merci à Jenny pour sa relecture et son écoute précieuses. Je n'oublie pas Marie, Agnès et Nico pour leur amitié et leur curiosité.

Je voudrais remercier également ma famille, particulièrement mes parents pour le goût des études, du travail et de l'ambition qu'ils m'ont transmis, pour leur aide et pour la relecture personnalisée de ce manuscrit. Enfin, je remercie du fond du cœur Joachim, pour son soutien de tous les instants, sa confiance, pour son humour apaisant et surtout pour sa présence qui met du piment dans mon quotidien.

Résumés	
Remerciements	i
Table des Matières	v
Liste des abréviations	ix
Introduction	1
Chapitre I État de l'art	
I. Métabolites secondaires de champignons filamenteux	9
I-1. Les mycotoxines	11
I-2. L'acide mycophénolique	29
II. Métabolisme, détoxification et transport	33
II-1. Phase I	34
II-2. Phase II : Conjugaison	40
II-3. Transport	40
III. Les standards internes et l'enrichissement isotopique	42
IV. Spectrométrie de masse : une technique analytique très sensible	48
IV-1. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse	48
IV-2. L'ionisation	49
IV-3. Le système dispersif	51
IV-4. L'analyseur : la trappe d'ion et l'Orbitrap	52
IV-5. Le détecteur	53
V. Exemples d'applications d'utilisations d'isotopes stables, développées pour des projets de recherche (en dehors du sujet exposé dans le présent manuscrit).	54
V-1. Projet AFSSET 2007-063 Environnement-santé-travail « Exposition au risque mycologique par inhalation. Effets sur le tractus pulmonaire de toxines produites par <i>Aspergillus fumigatus</i> »	54
V-2. AFSSET 08-27 : Identification des mycotoxines présentes dans des locaux insalubres.	55
V-3. P2 ANR PCV ISOMODTS : Conception de composés stables à visée anti-neurodégénérative basée sur les analogues de l'état de transition défini par mesures isotopiques.	56
Chapitre II Calculs théoriques d'un spectre de masse de composés contenant des teneurs variables en isotopes stables	
I. Rappels sur la spectrométrie de masse	61
II. Calculs théoriques du spectre de masse d'un composé de formule brute $C_nN_pO_qH_r$	63
II-1. Détails du calcul des probabilités nécessaires à la construction d'un spectre de masse	63
II-2. Exemples de la construction du spectre de masse de la zéaralénone ($C_{18}H_{22}O_5$).	66
II-3. Détermination de l'enrichissement optimal en ^{13}C .	69
III. Formulation et mise en équations du problème de prévision avec plusieurs isotopes d'un point de vue algorithmique	73
IV. Études des variations des différents paramètres considérés	74
IV-1. Variation de chaque paramètre séparément	75
IV-2. Variation des nombres d'atomes d'une part et des enrichissements d'autre part	78
IV-3. Conclusions	83

V. Résolution du problème inverse	84
V-1. Éléments de construction du programme C++ du problème inverse	84
V-2. Résultats expérimentaux	87
VI. Conclusions et perspectives	98

Chapitre III Métabolisme de la ZEN *in vitro*. Mise en évidence d'un nouveau métabolite

I. Précisions expérimentales préliminaires	105
I-1. Conditions expérimentales d'incubations	105
I-2. Chromatogrammes et aspects quantitatifs préliminaires	105
II. Activités des déshydrogénases mesurées à pH 4,5	107
II-1. Conditions expérimentales de formation des ZOLs	107
II-2. Inhibiteurs des HSDs	108
II-3. Conclusions	109
III. Activités mono-oxygénasiques des P450s mesurées à pH 7,4	110
III-1. Formation d'un nouveau métabolite OH-ZEN	110
III-2. Conditions optimales de formation de l'OH-ZEN	111
III-3. Métabolisme de la ZEN par des formes exprimées de cytochromes P450s	119
III-4. Conclusions	128
IV. Activité oestrogénique de l'OH-ZEN	129
IV-1. Les récepteurs oestrogéniques	130
IV-2. Conditions expérimentales	130
IV-3. Activité de l'OH-ZEN	131
IV-4. Conclusions	132
V. Identification structurale de l'OH-ZEN	133
V-1. Formation des analogues	133
V-2. Orbitrap: spectrométrie de masse très haute résolution	135
V-3. GC-MSn	138
V-4. Discussion et conclusion	141
VI. Discussion et conclusions	142

Chapitre IV Traçage isotopique du ¹³C

I. Effet isotopique expérimental	147
I-1. Production des métabolites secondaires	147
I-2. Métabolisme par les mammifères	151
I-3. Transport	163
I-4. Discussion et conclusion sur les effets isotopiques expérimentaux	170
II. Réactivité théorique	171
II-1. Approche thermodynamique	171
II-2. Réaction en phase gazeuse (gaz parfait)	173
II-3. Résultats dans l'eau	183
II-4. Résultats dans l'acétonitrile	188
II-5. Discussion et conclusions	190

Chapitre V Exemples d'utilisation de standards internes ¹³C

I. Dosages de zéaralénone dans différentes matrices	195
I-1. Dosage de la ZEN dans des extraits de céréales	195
I-2. Dosage de la ZEN naturelle contenue dans des extraits d'animaux traités (foie, plasma, urine)	200

II. Dosage d'acide mycophénolique	204
III. Conclusions	207

Chapitre VI Méthodes expérimentales

I. Incubations	211
I-1. Traitements des animaux et préparations des enzymes (Radu Duca)	211
I-2. Provenance des CYP	212
I-3. Protocole d'incubations de ZEN avec des microsomes hépatiques ou des formes exprimées de CYPs	212
II. Purifications-extractions	213
II-1. Extraction de la ZEN d'échantillons biologiques	213
II-2. Extraction sur phase solide de la ZEN à partir de matrices végétales	214
II-3. Purification de la ZEN glucuronide et de solutions brutes de ZEN 13C par HPLC semi-préparative	215
III. Analyse de la ZEN et de ses métabolites par couplage HPLC-MS	215
III-1. GC-MS (GC-HRMS), Laberca, Nantes.	216
III-2. LC-MS	216
IV. Mesure du transport de la ZEN sur Caco2	219
IV-1. Transport	219
IV-2. Cytotoxicité	220

Chapitre VII Conclusions et Perspectives 221**Références Bibliographiques** 229**Annexes**

- Annexe I : Calculs théoriques *ab initio*
- Annexe II : Publications et Communications
- Annexe III : Articles

ABBREVIATIONS

ABC	ATP-Binding Cassette
Ac Ac	Acide Acétique
Ac Et	Acétate d'Ethyle
ACN	Acétonitrile
AD	Ajout Dosé
ADP	Adénosine Di Phosphate
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMP	Acide MycoPhénolique
AMPaG	Acide MycoPhénolique acyl Glucuronide
AMPG	Acide MycoPhénolique phényl Glucuronide
ATP	Adénosine Tri Phosphate
AUC	Area Under the Curve
CEA	Commissariat de l'Énergie Atomique
CIA	Colonne d'Immuno-Affinité
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CF	Clofibrate
COMT	Catéchol-O-Méthyl-Tranférase
CSHPF	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
CYP	Cytochrome P450
DFT	Density Functional Theory
DJMTP	Dose Journalière Maximale Tolérable Provisoire
DJT	Dose Journalière Tolérable
DJTP	Dose Journalière Tolérable Provisoire
D_{KL}	Divergence de Kullback-Leibler
DL_{50}	Dose Létale pour 50% des individus exposés
DM	Déxaméthasone
DON	Déoxynivalénol
DSV	Direction des Sciences du Vivant
E_a	Énergie d'activation
E_2	Estradiol ou Estradiol
ER	Estrogenic Receptor
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food & Drug Administration
FB 1,2,3	Fumonisine B1, B2, B3
GC	Gaz Chromatography
GSH	Glutathion
HBSS	Hank's Ballanced Salt Solution
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSD	Hydroxy Steroid Dehydrogenase
IARC	Internal Agency for Research on Cancer
ID_{50}	Dose d'Inhibition pour 50% des individus exposés
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
<i>i.p.</i>	<i>Intra Peritoneale</i>
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LOAEL	Low Observed Adverse Effect Level
MMF	Mycophénolate Mofétil
MRP	Multi Drug Resistance Associated Protein
MS	Mass Spectroscopy
NCI	National Cancer Institute

β -NF	β -Naphthoflavone
NADP(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (Hydrogéné ou forme réduite)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OH-ZEN	Hydroxy-Zéaralénone
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (WHO en anglais)
PB	PhénoBarbital
PBS	Phosphate Buffer Saline
p.c.	Per Capita ou Poids Corporel
<i>p.o.</i>	<i>Per Os</i>
PG	Progestérone
PgP	P GlycoProtéine
PM	Poids Moléculaire
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RX	Rayons X
SAM	S-AdénosylMéthionine
SCF	Scientific Committee on Food
SG	Système Générateur de NADPH
SI	Standard Interne
SLC	Solute Carrier
SPE	Solid Phase Extraction
TMS	Tri Méthyl Silane
TOF	Time Of Flight
t-TDI	Dose journalière tolérable temporaire (Tolerable Drug Intake)
UDP	Uridine Di Phosphate
UGT	Uridine Di Phosphate Glucuronosyl Transférase
UV	Ultra Violet
VER	Verruculogène
ZAN	Zéaralanone
ZEN	Zéaralénone
α -ZAL	α -Zéaralanol
α -ZOL	α -Zéaralénol
β -ZAL	β -Zéaralanol
β -ZOL	β -Zéaralénol

*« On ne découvre pas de terre nouvelle sans consentir à perdre de vue, d'abord et longtemps,
tout rivage. »*

André Gide, Les Faux Monnayeurs.

INTRODUCTION

La compréhension de l'influence des facteurs environnementaux tels que les composés synthétiques ou d'origine naturelle sur la santé, constitue un vaste champ d'investigation. Il s'agit de quantifier précisément l'exposition aiguë ou chronique à de tels facteurs, d'identifier le rôle respectif de chacun des composants incriminés et de quantifier leur contribution dans la genèse ou l'aggravation de multiples pathologies, pour la plupart multifactorielles et dont l'étiologie reste mal connue. La connaissance de l'interaction de ces facteurs environnementaux avec les autres déterminants de la santé, qu'ils soient comportementaux, sociaux ou génétiques, constitue un défi pour la recherche scientifique. L'enjeu est aussi de comprendre les moyens disponibles permettant la protection de la santé des populations et les conditions qui doivent être réunies pour qu'une action ait les effets attendus. Dans ce but, les autorités nationales assurent le contrôle de la commercialisation, de l'usage, de la dissémination et la présence de certains produits. Par exemple des résidus et des produits de dégradation dans l'environnement ou dans l'alimentation, des substances chimiques, mais aussi des produits phytosanitaires, des additifs, des résidus de médicaments humains ou vétérinaires, ou encore des contaminants de l'environnement (dioxines, hydrocarbures polycycliques, mycotoxines). L'exposition à ces composés retrouvés au contact de l'homme devant être inférieure à des niveaux susceptibles d'avoir des effets indésirables sur la santé des consommateurs (INRA, 2004))

L'analyse des risques en matière de toxicologie environnementale présente des particularités qui la distinguent très nettement de celle qui peut être menée pour des composés chimiques destinés à être mis sur le marché. Pour un médicament par exemple, la substance est identifiée et présentée dans des formulations optimisées, dont les doses et les modalités d'usage sont précisées afin d'obtenir immédiatement les effets attendus. En revanche, la toxicologie environnementale est une toxicologie de faibles doses voire de traces. Elle est caractérisée par une exposition de type chronique, développant généralement sur de très longues durées des effets indésirables et faisant intervenir des mélanges complexes de substances interactives connues et inconnues dans des matrices complexes. Par conséquent, la toxicologie environnementale doit développer ses propres paradigmes et dégager ses priorités méthodologiques qui ne sont pas forcément celles de la toxicologie conventionnelle. Cela détermine les modalités de l'exposition de l'homme à ces xénobiotiques¹, influence leur

¹ Xénobiotique : Composé étranger à l'organisme vivant (Robert 1985).

biodisponibilité et conditionne leurs biotransformations au sein des différents biotopes¹. Il en résulte un ensemble de réactions dont le bilan est difficile à appréhender autrement que par une approche globale des effets liés à la matrice incriminée. Traditionnellement la toxicité des agents chimiques est étudiée individuellement, molécule par molécule conformément aux exigences réglementaires. Cette approche analytique est indispensable pour connaître le profil toxicologique d'un élément isolé et pour déterminer les profils toxicologiques à partir des relations doses-réponses. En revanche cette approche ne permet pas d'apprécier la toxicité au sein d'une matrice complexe, alors que les molécules étudiées ne le sont jamais en dehors de cette dernière et que des interactions peuvent avoir lieu et modifier leur profil toxicologique.

Ainsi, parmi les contaminants alimentaires, certains présentent des propriétés hormono-mimétiques. Il peut s'agir de propriétés oestrogéniques (semblables à celles des hormones femelles) ou anti-androgéniques (empêchant l'action d'hormones mâles). Ces substances, appelées xéno-œstrogènes, sont susceptibles d'agir sur le système endocrinien des animaux et de l'homme (Afsset, 1996-2000). Parmi elles, la zéaralénone, produite par des champignons de la famille des *Fusarium* (champignons filamenteux) et actuellement recherchée dans les viandes et aliments du bétail. Ses propriétés biologiques et chimiques peuvent faire craindre que la zéaralénone présente un risque pour la santé de l'homme en perturbant son équilibre hormonal. Cette mycotoxine a fait l'objet d'étude de cette thèse que j'ai menée au CEA de Saclay au sein de la Direction des Sciences du Vivant², sous la direction de Marcel Delaforge. L'objet de cette étude porte sur le métabolisme et le transport de cette mycotoxine dans l'organisme, grâce à l'aide analytique apportée par l'enrichissement isotopique uniforme au carbone ¹³C.

Notre intérêt a porté sur son devenir et celui de ses métabolites dans l'organisme, nous avons cherché à apporter des éléments de réponses aux questions suivantes :

- 1) Comment peut-on caractériser un des métabolites de la zéaralénone (un hydroxy-zéaralénone) par des mesures de spectrométrie de masse?
- 2) L'utilisation du marquage isotopique uniforme en ¹³C apporte-t-elle des informations complémentaires pour des études toxicologiques et des études du métabolisme ? Si oui,

¹ Biotope : milieu biologique déterminé offrant à une population animale ou végétale donnée des conditions d'habitat stables.

² Au sein de l'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (IBiTec-S), dans le Service de Bioénergétique, de Biologie Structurale et Mécanismes (SB²SM) et plus précisément dans le Laboratoire de Stress Oxydants et Détoxication (LSoD).

quels intérêts cette technique apporte-t-elle pour l'étude du métabolisme et/ou la quantification de mycotoxines ?

3) Quel enrichissement optimal permettrait l'étude d'autres composés ayant une teneur en carbone différente (autres mycotoxines) ?

Afin d'y répondre, nous aborderons dans l'ordre les différents points suivants :

- I. Présentation du contexte général relatif aux mycotoxines et à l'enrichissement isotopique ;
- II. Spectrométrie de masse et calculs théoriques de spectres de masse de composés uniformément enrichis avec des isotopes stables ;
- III. Métabolisme de la zéaralénone (ZEN) et résolution structurale du métabolite hydroxy-zéaralénone (OH-ZEN) ;
- IV. Effet isotopique d'un point de vue expérimental et théorique ;
- V. Exemple d'utilisation de standards internes enrichis au ^{13}C pour des études quantitatives ;
- VI. Présentation des méthodes expérimentales utilisées ;
- VII. Conclusions et perspectives.

CHAPITRE I

ETAT DE L'ART

I. Métabolites secondaires de champignons filamenteux

Parmi les métabolites secondaires d'origine fongique, les mycotoxines sont des composés toxiques qu'il est difficile de définir simplement et de manière exhaustive. Les mycotoxines sont des composés naturels de faible poids moléculaire, métabolites secondaires de champignons filamenteux appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Mycotoxines et moisissures productrices associées retrouvées en alimentation humaine et/ou animale (Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA 2006)

	Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Mycotoxines réglementées ou en cours de réglementation	Aflatoxines B1, B2, G1, G2 Ochratoxine A Patuline Fumonisines B1, B2, B3 Trichothécènes (DON) Zéaralène	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> <i>Byssosclamyces nivea</i> <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> <i>F. poae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i> <i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i> .
Autres mycotoxines	Alcaloïdes d'ergot (dit ergot du seigle) Citrinine Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...) Acide cyclopiazonique Stérigmatocystine Sporidesmines Stachybotryotoxines Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrème B) Phomopsines Toxines trémorgènes	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> <i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i> <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i> <i>Pithomyces chartarum</i> <i>Strachybotrys chartarum</i> <i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i> <i>Phomopsis leptostromiformis</i> <i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberrelum</i> <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>

Si les mycotoxines sont d'origine fongique, tous les composés toxiques produits par les champignons ne sont pas des mycotoxines. La cible et la concentration du métabolite sont d'importance. Ainsi des produits de champignons qui sont toxiques pour les bactéries (comme la pénicilline) sont habituellement appelés antibiotiques et ceux toxiques pour les plantes sont appelés des phytotoxiques (Bennett et Klich, 2003). On retrouve une application possible de ce type de produits dans l'agriculture : certains peuvent être des herbicides sélectifs (tentoxine) voire totaux. D'autres encore peuvent être des composés peptidiques comme l' α -amanitine produit par certaines amanites et qui est un inhibiteur de l'ARN polymérase II des eucaryotes (Michelot et Labia, 1988). Les mycotoxines, quant à elles peuvent se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et sont douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux.

Plus de 12 000 métabolites secondaires ont été identifiés d'après l'Antibase 2008 mais seule une trentaine possède de réelles propriétés toxiques préoccupantes. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale : notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes ainsi que les aliments composés et manufacturés destinés à l'alimentation humaine et animale (Charmley, 1995; Underhill, 1996; Charmley, 2000).

Il convient de préciser que certains aspects et effets des métabolites secondaires fongiques sont d'un grand intérêt pour l'homme et peuvent faire l'objet de recherches scientifiques :

- comme cela a été signalé, les phytotoxiques trouvent de nombreuses applications dans l'industrie agricole ;
- certains effets toxiques ont été étudiés et se sont révélés avoir un intérêt thérapeutique réel : c'est le cas en particulier de l'ergot de seigle dont la médecine a su tirer profit en utilisant son caractère vasodilatateur et a su retourner les effets pathogènes initialement découverts en effets thérapeutiques. Aujourd'hui, en médecine, les dérivés de l'ergot de seigle sont des molécules utilisées en particulier dans le traitement des crises de migraine.

Néanmoins, l'équilibre toxicité/propriétés thérapeutiques est parfois fragile. En effet, la réactivité de ces composés est étroitement liée à leur structure : le pharmacophore¹ et le

¹ Un pharmacophore est l'ensemble des groupements fonctionnels disposés selon un arrangement spatial adéquat, assurant la fixation du médicament sur le récepteur et donc capable d'induire la réponse physiologique.

toxiphore¹ peuvent avoir des agencements proches. La partie réactive de la molécule, reconnue par le pharmacophore (ou une autre partie de la molécule), peut se révéler instable et à l'origine de composés plus réactifs (époxydes ou radicaux). La toxicité recouvre alors les premiers effets thérapeutiques. C'est le cas, par exemple, de la cyclosporine qui, en dépit de propriétés immuno-suppressives, s'est avérée être un toxique rénal.

Ainsi, il est important de garder à l'esprit que 90% des médicaments sont issus de composés naturels et très peu sont entièrement de nature synthétique. Si les mycotoxines, par leur nombre important et leurs faibles doses sont encore mal connues, il n'en demeure pas moins qu'à côté des effets pathogènes qu'il est aujourd'hui nécessaire de prendre en compte, certaines présentent un potentiel thérapeutique certain, une fois leurs effets indésirables mis en évidence et maîtrisés. Ces derniers peuvent être limités par exemple par une hémisynthèse qui consisterait à inactiver le toxiphore.

L'objet de notre recherche est la mise au point de méthodes de dosages dans le cas particulier de la zéaralénone, notamment dans des matrices hétérogènes constituées par des grains de céréales. Si la ZEN ne présente aucun caractère thérapeutique comme cela sera précisé plus loin, les méthodes de dosage que nous avons développées sont applicables à d'autres composés naturels que la ZEN.

I-1. Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par des champignons (moisissures). Ces toxines fongiques sont diversifiées sur le plan chimique – elles appartiennent à différentes familles chimiques – et leur poids moléculaire varie approximativement de 200 à 500. Il existe des centaines de mycotoxines connues, mais peu d'entre elles ont fait l'objet de recherches poussées et nous ne disposons de méthodes d'analyse appropriées que pour un nombre plus restreint encore (Whitlow, 2001).

Les champignons qui les produisent, peuvent s'attaquer aux cultures dans les champs, pendant la manipulation ou l'entreposage. D'un point de vue pratique, une mycotoxine est un métabolite fongique qui cause un effet indésirable chez les animaux ou les humains qui y sont

¹ Le toxiphore est une partie ou un groupe d'atomes ayant une structure chimique qui est responsable des propriétés toxiques directes ou indirectes (après une activation métabolique) d'une molécule.

exposés. L'exposition se produit généralement par la consommation d'aliments contaminés, qu'il s'agisse d'aliments pour l'homme ou pour le bétail. Les mycotoxicoses sont des maladies causées par l'exposition à des aliments contaminés par des mycotoxines (Nelson *et al.*, 1993). Les mycotoxines produisent divers effets biologiques chez les animaux, dont une toxicité hépatique et rénale, des anomalies du système nerveux central, des réponses oestrogéniques, des pathologies respiratoires en cas d'inhalation (Aspergillose invasive) et autres effets.

On distingue parmi les mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire, *i.e.* parmi les produits contrôlés et faisant l'objet de normes et de recommandations, les aflatoxines, l'ochratoxine A, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone et les trichothécènes (notamment le déoxynivalénol et la toxine T-2) (Charmley, 1994). Il convient de remarquer que la toxicité peut varier très largement d'une toxine à une autre et que le danger ne provient pas toujours de la toxine elle-même, mais peut aussi provenir de ses métabolites. Historiquement, la mycotoxicose la plus anciennement connue en France est l'ergotisme. Dès le moyen-âge des effets hallucinogènes produits par l'ingestion d'un parasite du seigle, l'ergot du seigle ou *Claviceps purpurea*, ont été décrits. Les symptômes se présentaient sous la forme de délires, prostrations, douleurs violentes, abcès, gangrènes des extrémités aboutissant à des infirmités graves et incurables. Des épidémies ont sévi du VIII^{ème} au XVI^{ème} siècle en raison des conditions d'alimentation misérables des populations, en particulier la consommation de farines contaminées par les sclérotés¹ de ces champignons. En France, le dernier épisode s'est produit en 1951 à Pont Saint-Esprit, dans le Gard. De nos jours, on sait que le « Feu de Saint Antoine » est attribuable à certains alcaloïdes produits par l'ergot de seigle. De plus, vers 1900, des chercheurs japonais relieront certaines manifestations cliniques à l'ingestion de riz moisie. En U.R.S.S. entre 1942 et 1947 de très nombreuses personnes décéderont (jusqu'à 10% dans certaines collectivités) suite à la consommation de blé et de millet contaminés par un micro-organisme du genre *Fusarium*.

Enfin, au début des années 60, la caractérisation des aflatoxines sera le point de départ de recherches systématiques sur les mycotoxines et leurs effets. Le fait que les aflatoxines se soient avérées être les plus puissants cancérigènes naturels ne sera pas étranger à ce soudain intérêt. Depuis cette date la liste des moisissures reconnues aptes à produire des toxines ne cesse de s'allonger. En fait, des moisissures toxinogènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides, dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs

¹ Peloton mycélien formé par certains champignons pour résister à des conditions défavorables.

et de l'humidité. D'où la grande variété de substrats alimentaires et environnementaux concernés. Néanmoins les céréales présentent le plus grand facteur de risque compte tenu de leur consommation importante et de la fréquence de leur contamination. Dans les années 80, la Food and Agriculture Organization (FAO) estimait qu'au moins 25% des grains produits dans le monde étaient contaminés par des mycotoxines. Ce phénomène est d'autant plus important qu'il gagne du terrain : avec le réchauffement climatique, des zones géographiques qui jusque là ne présentaient pas (ou peu) de contamination fongique, deviennent propices au développement de souches productrices de mycotoxines.

Enfin, outre les problématiques sanitaires posées par la contamination des mycotoxines, des aspects socio-économiques inhérents émergent depuis peu. Si, pour exporter leurs céréales, les pays en voie de développement se soumettent aux réglementations sanitaires strictes relatives à l'alimentation humaine et animale des pays développés, les populations locales restent largement exposées aux risques mycotoxiques à travers des marchés locaux non contrôlés. C'est le cas, par exemple de l'Afrique du sud (présentation orale de Gordon Shephard lors du XII^e congrès international de l'IUPAC sur les mycotoxines et les phycotoxines, qui s'est tenu du 21 au 25 mai 2007 à Istanbul).

Les effets chroniques (exposition répétée à de faibles voire très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence de ces toxines. En outre, un aliment ou un autre support peut contenir plusieurs mycotoxines en même temps.

I-1.1 Prolifération des moisissures et formation des mycotoxines

Il est probable que les principaux genres de champignons producteurs de mycotoxines, au regard des recherches effectuées en Amérique du Nord, soient *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Whitlow, 2001). Plusieurs espèces de ces champignons produisent des mycotoxines dans les aliments. Les moisissures sont des champignons qui se développent en colonies multicellulaires, par opposition aux levures qui sont des champignons unicellulaires. Les moisissures peuvent proliférer et produire des mycotoxines avant ou après la récolte ou pendant l'entreposage, le transport, la transformation ou l'alimentation. La prolifération des moisissures et la production de mycotoxines sont associées à des extrêmes climatiques, à des pratiques d'entreposage inadéquates, à une piètre qualité des aliments, ainsi qu'à de mauvaises conditions d'alimentation. En général, des conditions environnementales (chaleur, eau, dommages causés par les insectes) stressent les végétaux et les prédisposent à la contamination par des mycotoxines au champ. Après la récolte, la température, la teneur en

eau et l'activité des insectes sont les principaux facteurs qui influencent la contamination des céréales fourragères et des aliments par les mycotoxines (Coulombe, 1993).

Les moisissures prolifèrent à des températures qui s'échelonnent entre 10 et 40°C, à un pH pouvant se situer entre 4 et 8, et à un taux d'humidité supérieur à 0,7 a_w (humidité relative d'équilibre). Alors que les levures nécessitent de l'eau libre, les moisissures peuvent se développer sur une surface sèche (Lacey, 1991). Elles peuvent aussi proliférer sur des aliments qui contiennent plus de 12 ou 13% d'humidité. Dans les aliments humides comme le fromage, des moisissures (ex : *Penicillium roqueforti*) se développeront en présence d'oxygène et à un pH approprié. Étant donné que la plupart des moisissures sont aérobies, les milieux très humides qui excluent un apport d'oxygène adéquat peuvent prévenir le développement des moisissures. Les conditions les plus favorables à leur prolifération pourraient ne pas coïncider avec les conditions optimales pour la formation de mycotoxines en laboratoire. Par exemple, on a observé que des moisissures du genre *Fusarium* prolifèrent entre 25 et 30°C sans produire beaucoup de mycotoxines, tandis qu'à des températures proches du point de congélation, une grande quantité de mycotoxines sont produites alors que les moisissures ne présentent qu'une croissance minime (Joffe, 1986). Les traitements fongicides aux champs pourraient réduire la prolifération des moisissures, et de ce fait, la production de mycotoxines, mais le stress ou le choc causés par le fongicide sur la moisissure pourrait au contraire stimuler la production de mycotoxines (Boyacioglu *et al.*, 1992; Gareis et Ceynowa, 1994). Par comparaison avec les *Fusarium*, les espèces du genre *Aspergillus* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est moindre et les températures, plus élevées. C'est pourquoi *Aspergillus flavus* et les aflatoxines infestent plus fréquemment le maïs cultivé dans les conditions de stress causées par la chaleur et la sécheresse dans les climats plus chauds. La contamination par les aflatoxines est aggravée par les dommages infligés par les insectes avant et après la récolte qui créent des orifices de pénétration pour les champignons. Les espèces du genre *Penicillium* prolifèrent en présence d'une activité hydrique relativement faible et à basse température, et sont très répandues. Comme les *Aspergillus* et *Penicillium* ne nécessitent qu'une faible activité hydrique pour se développer, on les considère comme des champignons d'entreposage (Christensen *et al.*, 1977).

I-1.2 Toxicité et modes d'action

La plupart des études de toxicité sont relatives à l'ingestion d'aliments contaminés, mais l'inhalation et l'exposition cutanée sont également à l'origine de signes de toxicité. Ainsi les effets toxiques des nombreuses mycotoxines, notamment celles que l'on rencontre le plus communément, sont bien documentés chez plusieurs espèces animales et chez l'homme (Trenholm, 1988; 1996-1997). La toxicité de ces contaminants naturels peut être directe ou indirecte. Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée suite à l'exposition unique à une forte dose. Dans tous les cas, les effets chroniques (exposition répétée à de faibles voire très faibles doses) sont les plus redoutés en raison du pouvoir de rémanence de ces toxines souvent résistantes aux températures et aux procédés technologiques mis en œuvre dans l'industrie alimentaire (Sorensen et Elbaek, 2005). La toxicité est variable (Tableau I.2), certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées être cancérigènes (aflatoxines, ochratoxine A, fumonisines). Certaines mycotoxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent oestrogéniques (zéaralénone), immunotoxiques, hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines) ou encore dermonécrosantes (trichothécènes) (Bunger, 2004).

Tableau I.2 : Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA 2006).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 + M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation lipidique Bioactivation par cytochromes P450 Conjugaison aux GS-transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP Détoxification par les peptidases
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse <i>in vitro</i>	Inhibition indirecte d'enzymes
Trichothécènes (Toxine T-2, DON, ...)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l'apoptose sur progéniteur hématopoïétique et cellules immunitaires Impact sur la synthèse des protéines Altération des immunoglobulines
Zéaralénone	Fertilité et Reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques Bioactivation par des réductases Conjugaison aux glucuronyltransférases
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinganine/sphingosine Altération du cycle cellulaire

Tableau I.3 : Effets de quelques mycotoxines sur certains organes chez l'homme

Mycotoxine	Foie	Tube digestif	Système nerveux	Rein	Glandes endocrines	Peau	Sang
Aflatoxine B1	+	+	+	+	+		
Ochratoxine A	+		+	+			+
Vomitoxine	+	+	+			+	+
T2-toxine	+	+	+			+	+
Zéaralénone				+	+		
Fumonisine B1							

Les mycotoxines exercent leurs effets par le biais de trois mécanismes principaux :

(1) **Réduction de la quantité d'éléments nutritifs disponibles pour l'animal.** Cet effet est le fruit d'un processus multifactoriel. En premier lieu, il peut se produire une altération de la teneur en éléments nutritifs des aliments pendant le processus de moisissure. La prolifération des moisissures peut réduire la teneur en éléments nutritifs tels que les vitamines, et la teneur en acides aminés tels que la lysine (Kao et Robinson, 1972). Ainsi, les moisissures ont généralement pour effet de réduire la valeur énergétique des aliments pour animaux. Deuxièmement, certaines mycotoxines, du fait de considérations qualitatives (goût, odeur, etc.) réduisent la consommation alimentaire et par conséquent, l'apport en éléments nutritifs. Troisièmement, une irritation de l'appareil digestif induite par des mycotoxines peut réduire l'absorption des éléments nutritifs. Quatrièmement, certaines mycotoxines perturbent le métabolisme normal des éléments nutritifs : c'est le cas de l'inhibition de la synthèse des protéines par la toxine T-2.

(2) **Effets sur le système endocrinien** et les glandes exocrines. L'effet de la zéaralénone sur la performance reproductrice, à cause de son action oestrogène, en est un exemple. Les effets oestrogéniques de la zéaralénone résultent de l'affinité de cette mycotoxine et de ses dérivés pour les récepteurs oestrogéniques de l'animal (Kiang *et al.*, 1978).

(3) **Immunosuppression.** Les effets des mycotoxines sur les défenses immunitaires ont été étudiés (Sharma, 1993). Les trichothécènes, tels que le DON et la toxine T-2, réduisent l'immunité par l'inhibition de la synthèse des protéines et donc de la prolifération cellulaire. Certaines mycotoxines exercent une action cytotoxique sur les lymphocytes *in vitro*. Les corticostéroïdes produits en réaction au stress réduisent aussi la fonction immunitaire.

Certains des symptômes observés dans les mycotoxicoses peuvent être de nature secondaire, c'est-à-dire qu'ils résultent d'une affection opportuniste présente à cause de

l'immunosuppression. On constate donc que la progression et la diversité des symptômes prêtent à confusion et que le diagnostic est difficile (Hesseltine, 1986; Schiefer, 1990). En fait, le diagnostic est également compliqué par le manque de recherches pertinentes, le manque d'analyses des aliments pour animaux, par des symptômes non spécifiques et par les interactions avec d'autres facteurs de stress. Devant ce constat, il convient de mettre en place des moyens de prévention incluant des stratégies agronomiques (bonnes pratiques agricoles incluant le choix des variétés, les pratiques culturales, les traitements phytosanitaires...), l'amélioration des conditions de récolte et de stockage et l'amélioration du suivi tout au long de la chaîne alimentaire. Le cas du mode de production biologique restreint le recours aux traitements fongicides mais privilégie des techniques défavorables à la contamination par les mycotoxines telles que la rotation des cultures, le travail du sol ou la faiblesse des apports azotés. Les données disponibles de contamination de produits issus de l'agriculture biologique par les mycotoxines, bien que limitées, montrent des taux de contamination variables, sans qu'il puisse être dégagé de grandes différences avec ceux des produits issus de l'agriculture conventionnelle (Bellon *et al.*, 2000).

I-1.3 Évaluation du risque et aspects législatifs

Issues d'une contamination généralement reconnue comme d'origine végétale, les mycotoxines constituent donc un problème très actuel de qualité et de sécurité des aliments. L'évaluation du risque mycotoxique demeure délicate pour plusieurs raisons :

- ce risque est d'essence naturelle ce qui empêche l'homme d'en maîtriser la survenue (conditions climatiques notamment),
- il est pernicieux car la contamination fongique est difficilement contrôlable,
- et enfin il peut être multiple en raison de la capacité d'une même moisissure à produire différentes mycotoxines (AFSSA, 2006).

De nombreuses études ont démontré que plusieurs mycotoxines peuvent se trouver dans un même aliment (Hagler *et al.*, 1984). Par exemple, Abbas *et al* ont démontré que des espèces de *Fusarium* isolées dans du maïs au Minnesota ont produit de multiples mycotoxines.(Abbas *et al.*, 1989). Étant donné que les animaux sont nourris d'un mélange d'aliments et que les moisissures produisent toute une gamme de mycotoxines, de nombreuses interactions entre mycotoxines sont possibles.

À cause de leur dégradation partielle dans le rumen, les mycotoxines sont moins toxiques pour les bovins que pour la plupart des autres animaux. Par contre, les mycotoxines ne sont pas complètement dégradées et certains des produits de dégradation demeurent toxiques (Kiessling *et al.*, 1984). Les facteurs alimentaires connus pour interagir avec les mycotoxines englobent des éléments nutritifs tels que les matières grasses, les protéines, les fibres, les vitamines et les minéraux (Smith *et al.*, 1971; Brucato *et al.*, 1986; Coffey *et al.*, 1989). Les agents d'agglomération utilisés dans les aliments (argile) et d'autres additifs, tels que les glucomannanes, lient certaines mycotoxines entre elles et réduisent ainsi l'exposition de l'animal (Diaz *et al.*, 1999). Galvano *et al.* ont récemment étudié l'interaction de mycotoxines avec des facteurs alimentaires tels que des antioxydants, des constituants alimentaires, des herbes médicinales, des extraits de végétaux et des agents d'agglomération minéraux et biologiques (Galvano *et al.*, 2001). Certains de ces facteurs alimentaires modifient la réponse des animaux aux mycotoxines, ce qui a pour effet de générer des réactions variables sur le terrain, mais aussi de nous fournir des pistes pour moduler la toxicité pour les animaux. Ainsi, les approches alimentaires semblent prometteuses pour ce qui est de protéger les animaux contre les effets des mycotoxines et d'enrayer le plus possible le risque que des mycotoxines ne contaminent les aliments destinés à la consommation humaine.

Certains des facteurs qui rendent le diagnostic difficile contribuent aussi à la difficulté de fixer des seuils d'innocuité. Il s'agit notamment du manque de recherches, des écarts de sensibilité entre les espèces d'animaux, de l'imprécision de l'échantillonnage et des analyses, du grand nombre de mycotoxines potentielles, des interactions avec d'autres mycotoxines et des interactions avec le stress suscité par l'environnement et la production (Hamilton, 1984; Schaeffer et Hamilton, 1991). Les effets des mycotoxines sont également modulés par des facteurs tels que le sexe, l'âge, l'alimentation et la durée de l'exposition. Il est donc impossible de fournir des directives précises quant aux concentrations de mycotoxines qui produiront une mycotoxicose sur le terrain. Les recommandations qui fournissent des concentrations dangereuses de mycotoxines visent plutôt à communiquer les plus faibles concentrations de mycotoxines qui ont été associées à des mycotoxicoses (Tableau I.4). C'est dans ce contexte qu'en Europe, depuis le 1^{er} juillet 2006, une réglementation fixant les taux acceptables de fusariotoxines (déoxynivalénol, zéaralénone et fumonisines) dans les produits à base de céréales destinés à l'alimentation humaine (Règlement n°856/2005 du 6 juin 2005 : Kyprianou, 2005) a été mise en place. Ces taux seuils tiennent compte des niveaux

d'exposition estimés à partir des niveaux de contamination des céréales ainsi que des études de toxicités menées chez l'animal (JECFA, 2000).

Tableau I.4 : Règlements européens en vigueur pour la limitation des teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme (n° 466 du 8/03/2001, JOCE L77 ; n° 472 du 12/03/2002, JOCE L75 ; n° 257 du 12/02/2002, JOCE L41)

Mycotoxines	Denrées	Teneurs maximales admissibles (µg/kg)
Aflatoxine B1	• Arachides, fruits à coque et séchés, et produits dérivés	2
	• Arachides soumises à traitement physique avant consommation ou ingrédients	8
	• Fruits à coque et séchés soumis à traitement physique avant consommation ou ingrédients	5
	• Céréales et dérivés, consommation directe ou ingrédients	2
	• Céréales soumises à traitement physique avant consommation ou ingrédients	2
Aflatoxine B1	• Épices (poivre, piments, paprika, noix de muscade, gingembre, safran)	5
Aflatoxine M1	• Lait	0,05
Zéaralénone	• Céréales et produits dérivés, grains bruts	50
	• Huiles végétales	200
Ochratoxine A	• Céréales (dont riz et sarrasin) et produits dérivés, grains bruts	5
	• Produits dérivés et grains à consommation directe	3
	• Raisins secs	10
Patuline	• Jus de fruits (pomme) et nectar de fruits	50
	• Boissons spiritueuses, cidres et boissons fermentées	50
	• Produits à base de morceaux de pomme (compote et purée)	25
	• Jus de pomme et produits à base de morceaux de pomme (compote et purée) pour nourrissons et enfants en bas âge	10

I-1.4 La zéaralénone

La zéaralénone est une lactone macrocyclique dérivée de l'acide résorcyclique (Resorcyclic Acid Lacton, d'où l'acronyme RAL), de formule brute $C_{18}H_{22}O_5$. Sa formule développée est

représentée sur la Figure I.1 Sa dénomination scientifique est : (-)-(3S,11E)-3,4,5,6,9,10-hexahydro-14,16-dihydroxy-3-méthyl-1H-2-benzoxacyclotétradécin-1,7(8H)-dione (Merk-Index, 1996). La zéaralénone naturelle existe sous forme de l'isomère *trans* et présente une configuration S grâce à son groupement méthyle en position C3 (Kuo *et al.*, 1967). Elle est thermostable et résiste à une température de 120°C pendant 4 heures (Trenholm, 1982). Elle possède des métabolites naturels : α - et β - zéaralénol (α - et β -ZOL) et α - et β - zéaralanol (α - et β -ZAL) qui peuvent être coproduits avec la ZEN par les champignons et que l'on peut donc retrouver avec la ZEN sur des céréales contaminées.

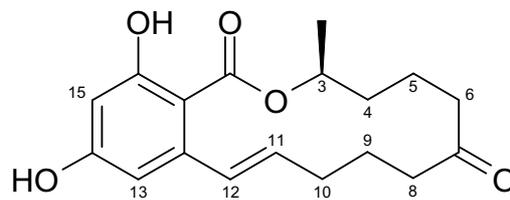


Figure I.1: Zéaralénone (ZEN)

Si la zéaralénone représente une source de toxicité dans l'alimentation, certains de ses métabolites comme l' α -zéaralanol (Figure I.2) présentent un danger important en termes de santé.

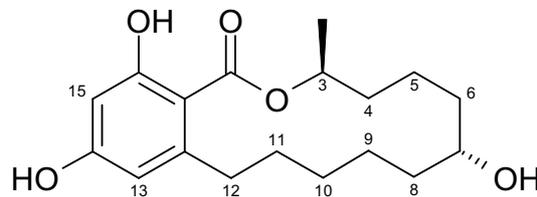


Figure I.2 : α -Zéaralanol (α -ZAL)

Il est couramment utilisé aux Etats Unis depuis 1969 comme promoteur de croissance (Ralgro ND) pour améliorer le taux d'engraissement du bétail. L'utilisation de ce produit a été interdite au sein de l'Union Européenne en 1989, mais reste autorisée en Amérique du Nord et en Nouvelle-Zélande (Gaumy *et al.*, 2001).

De longues expériences sur les rats, les chiens et les singes ont montré que l' α -zéaralanol était un œstrogène-mimétique dont les effets principaux étaient des modifications au niveau des glandes mammaires ou des organes du système reproducteur.

L'étude des propriétés physiques et chimiques de la zéaralénone suggère que ce composé présente des caractéristiques idéales pour une large diffusion à l'intérieur des tissus. La très importante disparité de sensibilité entre espèces aux effets de la zéaralénone pourrait en partie résulter de différences métaboliques. Voyons plus en détail la production, le métabolisme, l'absorption, la distribution et l'excrétion de la zéaralénone.

I-1.4.1. Production et exposition

La zéaralénone est une mycotoxine produite par des champignons du genre *Fusarium* et en particulier par *F. graminearum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* et *F. culmorum* mais toutes les souches ne sont pas productrices de zéaralénone (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). Cette mycotoxine est un contaminant naturel des céréales, surtout du blé et du maïs, mais également de certains fruits et légumes (bananes, haricots, noix...), et peut également se retrouver dans des produits animaux comme le lait, le foie et les œufs par le biais de la contamination de l'alimentation animale. La contamination par la zéaralénone est un phénomène mondial, le champignon producteur se développant facilement dans tout type de conditions climatiques mais préférentiellement à basses températures. La ZEN est produite par des souches de *Fusarium* présentes en Australie, en Europe et en Amérique du Nord (Vesonder *et al.*, 1991), en Nouvelle-Zélande (di Menna *et al.*, 1997), dans les Philippines, en Thaïlande et en Indonésie (Yamashita *et al.*, 1995). La ZEN a aussi été détectée dans des denrées alimentaires en Amérique du Sud (Dalcero *et al.*, 1997; Molto *et al.*, 1997), en Afrique (Doko *et al.*, 1996), à Taïwan, en Chine et en Russie (Ueno *et al.*, 1986).

D'un point de vue quantitatif, la ZEN et ses métabolites ont été retrouvés sur diverses céréales ou produits dérivés en Europe à des taux allant de quelques microgrammes par kilogramme à 8000 µg/kg (Placinta *et al.*, 1999). L'apport moyen estimé pour la population française est de 30 ng/kg p.c.¹/j chez les adultes normoévaluants de 15 ans et plus et de 70 ng/kg p.c./j chez les enfants de 3 à 14 ans. Le vecteur contribuant le plus à cette exposition est représenté à plus de 60% par les produits dérivés des céréales et en particulier par les céréales du petit déjeuner (entre 12 et 23%)².

¹ p.c. : poids corporel ou *per capita*.

² Étude menée au sein de l'unité métabolique de l'INRA pendant une durée de 11 mois au total sur une population française (provenant des régions sud, est et ouest) composée de 2492 individus dont 1474 âgés de 15 ans et plus et 1018 enfants de 3 à 14 ans et une sélection de 338 aliments.

I-1.4.2. Métabolites connus

Le métabolisme animal de la zéaralénone et de l' α -zéaralénol a été étudié sur plusieurs espèces animales et sur l'humain. Il a été alors montré que l' α -zéaralénol est majoritairement métabolisé en son diastéréoisomère le β -zéaralénol et dans une moindre proportion en zéaralanone (Figure I.3). Les proportions dépendent largement de l'espèce animale (Kleinova *et al.*, 2002).

La biotransformation de la zéaralénone chez les rats se fait principalement par deux voies :

- la réduction en α -zéaralénol et en β -zéaralénol (Figure I.3) ;
- la conjugaison de la zéaralénone et de ses métabolites avec l'acide glucuronique (Kiessling et Pettersson, 1978; Ueno et Tashiro, 1981) ;

La biotransformation de zéaralénone en zéaralénols consiste en la réduction de la fonction cétone en 7^e position. Cette réaction montre des similitudes avec des processus de métabolisme stéroïdien qui sont catalysés par des hydroxystéroïdes déshydrogénases (HSDs) (Malekinejad *et al.*, 2005). Les HSDs appartiennent à la super famille des petites chaînes déshydrogénases/réductases (SDRs) qui catalysent les réactions d'oxydation /réduction dans la synthèse et l'inactivation d'hormones stéroïdiennes (Penning, 2003; Persson *et al.*, 2003). Les principales enzymes de phase I impliquées dans la biotransformation de la ZEN sont la 3 α et la 3 β hydroxystéroïde déshydrogénase (3 α - et 3 β -HSD). Les organes qui sont le lieu de ces transformations sont l'intestin, le foie et les organes cibles de la ZEN (gonades par exemple). Les stéroïdes étant aussi pris en charge par ces enzymes, la ZEN peut moduler, par compétition le métabolisme des stéroïdes (Malekinejad *et al.*, 2006).

La 3 α -HSD appartient à la superfamille des aldéhydes cétones réductases, fonctionnant comme des oxydo-réductases NAD(P)H-dépendantes, qui réduisent les cétones en alcool. Parmi les substrats endogènes de ce groupe d'enzyme, se trouvent les hormones stéroïdes et les prostaglandines. La 3 β -HSD appartient quant à elle, à la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte qui catalysent la conversion des 3 hydroxy-ene-stéroïdes (par exemple conversion de la prégnénolone en progestérone).

Malekinejad *et al.* ont montré une grande variabilité inter-espèces des rapports de formation α et β -ZOL sur des microsomes hépatiques : l' α -ZOL est majoritairement formé chez le porc et chez l'homme alors que chez les volailles et les ruminants, le β -ZOL est prédominant (Malekinejad *et al.*, 2006).

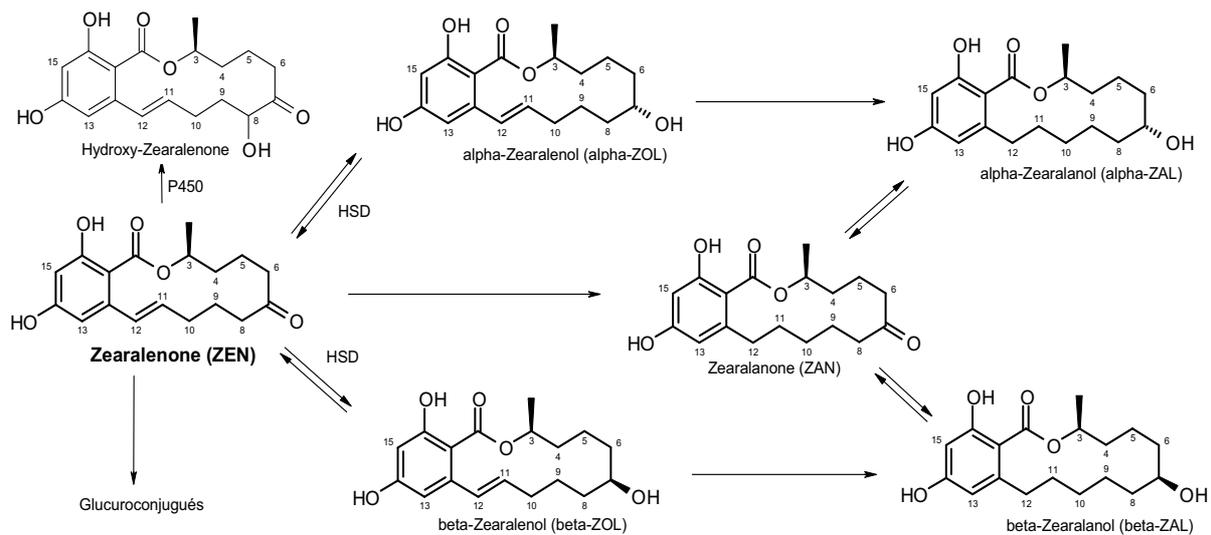


Figure I.3 : Schéma récapitulant les différentes voies métaboliques de la ZEN chez le mammifère.

Par ailleurs, il a été récemment mis en évidence (Malekinejad *et al.*, 2005; Malekinejad *et al.*, 2005) que la formation d' α -zéaralénol augmentait en présence de NADPH, alors que celle de β -zéaralénol augmente seulement en présence de NADH. Le pH optimal pour la production d' α -zéaralénol est à 5,6 et celui du β -zéaralénol est de 7,4.

Enfin, la ZEN et ses dérivés peuvent être conjugués par les UDP-glucuronyl-transférases pour être excrétés dans l'urine et la bile (Mirocha *et al.*, 1981). Plus précisément, 27% de la ZEN y est retrouvée sous forme de glucuro-conjugués, 88% de l' α -ZOL et 94% du β -ZOL (Zollner *et al.*, 2002).

I-1.4.3. Absorption et distribution

Les cinétiques d'absorption de la ZEN ont montré qu'elle est très rapidement absorbée au niveau intestinal : entre 80 et 85% chez le porc (Biehl *et al.*, 1993).

L'importante excrétion urinaire de la zéaralénone et de ses dérivés montre que l'absorption est importante chez les rats, les lapins et l'homme (Mirocha *et al.*, 1981; Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). Ces phénomènes sont précédés d'une métabolisation par la flore digestive et les entérocytes. Chez le rat, la demi-vie de la ZEN au niveau intestinal est de 5 minutes et seulement 0,0095% de la dose initialement administrée sous forme de perfusion dans l'intestin, sont retrouvés dans l'intestin au bout d'une heure (Ramosa *et al.*, 1996).

Chez le porc, l'utilisation d'un modèle simulant le tractus gastro-intestinal a permis de déterminer que l'absorption de la ZEN s'effectue principalement au niveau du jéjunum¹ (70% de la dose absorbée) et de l'iléum² (30% de la dose absorbée) (Avantaggiato *et al.*, 2003).

Du point de vue de la distribution, la ZEN franchit la barrière placentaire chez le porc et les rongeurs (Bernhoft *et al.*, 2001). Néanmoins, la ZEN et ses métabolites se concentrent principalement dans le foie et la bile de manière dose-dépendante ainsi que dans les organes possédant des récepteurs oestrogéniques (utérus, follicules ovariens, tissus adipeux et cellules interstitielles des testicules) (Appelgren *et al.*, 1982; Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). Ceci laisse supposer une élimination progressive des tissus, résultant de l'excrétion biliaire importante de la ZEN et de ses métabolites (Biehl *et al.*, 1993).

Enfin, chez l'homme, la demi-vie plasmatique de l' α -zéaralénol tritié (administré par voie orale) est d'environ 22 heures. Le pic de concentration obtenu est beaucoup plus important chez l'homme que chez les autres espèces étudiées (dont le singe) (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

I-1.4.4. Élimination

L'excrétion de la zéaralénone et de ses dérivés peut se faire par voie biliaire, urinaire, mais aussi lactée. Les urines et les matières fécales sont les principales voies d'élimination de la ZEN (JECFA, 2000). Un résumé de l'excrétion de la zéaralénone et de ses métabolites dans l'urine et dans les matières fécales de bovins, de porcins et de rats est présenté dans le Tableau I.5 (Gaumy *et al.*, 2001). Les taux d'excrétion mesurés indiquent une variabilité inter-espèce.

Tableau I.5 : Métabolisme comparé de la ZEN : distribution des métabolites dans l'urine et les matières fécales (Mirocha *et al.*, 1981).

Espèce animale	Urine*			Matières fécales*		
	ZEN	α -ZOL	β -ZOL	ZEN	α -ZOL	β -ZOL
Bovin	29	20	51	25	12	58
Porc	63	32	5	91	9	ND
Rat	93	4	3	97	ND	3

* en % de la quantité excrétée

Si aucune étude sur le passage de la zéaralénone et de ses dérivés dans les œufs n'a été faite, les études s'accordent sur le faible taux de transfert de la ZEN et de ses métabolites dans le

¹ Jéjunum : partie centrale de l'intestin grêle.

² Iléum : dernière partie de l'intestin grêle

lait (Shreeve *et al.*, 1979; Prelusky *et al.*, 1990). La ZEN peut être détectée dans le lait de truie 42 à 44 heures après consommation de l'aliment contaminé avec 40 ppm de zéaralénone, et jusqu'à 5 jours après son retrait (Palyusik *et al.*, 1980). Les analyses des échantillons de lait ont montré la présence de 82 à 86% de β -zéaralénol, 13,4 à 15,7 % d' α -zéaralénol et 0,5 à 1,3 % de zéaralénone. La concentration maximale en zéaralénol trouvée dans le lait de truie est de 0,575 à 0,790 ppm. Chez des vaches laitières, un passage de petites quantités de zéaralénone dans le lait a été mesuré (Hagler *et al.*, 1980). Une administration de 25 ppm de zéaralénone dans la nourriture pendant 7 jours est suivie d'une excrétion de zéaralénone et de ses dérivés (α et β -zéaralénol) dans le lait (Mirocha *et al.*, 1981). Les composés excrétés sont présents sous forme libre et sous forme conjuguée (glucurono et sulfoconjugués) dans des ordres de grandeur équivalents (Gaumy *et al.*, 2001).

Le devenir dans l'organisme de la zéaralénone est ainsi dominé par l'importante hétérogénéité inter-espèces existant dans son métabolisme. Bien que l'activité de conjugaison de la zéaralénone l'emporte largement sur l'activité de réduction dans la plupart des espèces animales, cette dernière est la plus importante du point de vue toxicologique, avec l'élaboration de dérivés encore plus toxiques que le composé parental (phénomène de bioactivation, *cf* paragraphe suivant). Voyons à présent la toxicité de cette mycotoxine et de ses dérivés.

I-1.4.5. Toxicité

C'est une molécule à activité oestrogénique classée dans la catégorie L (preuve limitée d'un point de vue de la carcinogénicité) chez l'animal par l'IARC. D'après la consommation d'aliments contaminés par des animaux domestiques, un hyper oestrogénisme a été observé chez les animaux de la ferme, notamment chez les truies (Liu *et al.*, 1985) et chez les vaches (Diekman et Green, 1992). Des expériences *in vivo* et *in vitro* indiquent que la ZEN et ses métabolites sont des substrats de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes. Par conséquent, vue l'interaction avec les récepteurs oestrogéniques, la ZEN est associée aux composés connus comme des perturbateurs endocriniens. Elle est classée comme œstrogène non stéroïdien ou mycoestrogène ou même parfois comme phytoestrogène. En dépit de sa structure non-stéroïdienne, la ZEN active des récepteurs d'œstrogène impliquant le changement fonctionnel et morphologique des organes reproducteurs (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; JECFA, 2000).

Ainsi, la ZEN ressemble suffisamment au 17β -estradiol pour se lier avec une forte affinité aux récepteurs oestrogéniques dans les cellules cibles de mammifères. Parmi les animaux de ferme, des porcs sont considérés comme l'espèce la plus sensible. Les signes cliniques de l'exposition incluent, chez la femelle, l'atrophie ovarienne, une baisse de fertilité, une augmentation des résorptions fœtales, une diminution de la taille des portées, des changements de poids des glandes hypophysaires ainsi que des modifications des niveaux sériques de progestérone et d'estradiol. Une fibrose de l'utérus, des tuméfactions vulvaires et mammaires ainsi qu'une augmentation des follicules vésiculaires au niveau des ovaires ont également été mentionnées (JECFA, 2000). Chez les mâles, la ZEN entraîne une baisse de la capacité de reproduction, une atrophie testiculaire, une inflammation de la prostate, une féminisation des jeunes mâles ainsi qu'une diminution des taux sériques de la testostérone (Zinedine *et al.*, 2007). Des études auto-radiographiques de la [3 H]-ZEN chez les souris, ont démontré que la localisation dépendait du statut reproducteur : chez les souris gravides, la zéaralénone et/ou ses métabolites ont été trouvés seulement dans les foetus en fin grossesse, principalement dans les reins, la bile et le tissu conjonctif (Appelgren *et al.*, 1982).

Il est important de noter que la zéaralénone diffère de ses métabolites par son potentiel oestrogénique. La première preuve de cette différence de potentiel a été obtenue lors d'études par Katzenellenbogen *et al.* en 1979 (Katzenellenbogen *et al.*, 1979) sur les récepteurs hormonaux. Plus récemment, Shier et son équipe (Shier *et al.*, 2001) ont montré la relation entre structure et activité de la zéaralénone sur des expériences cellulaires, utilisant des cellules humaines mammaires d'adénocarcinome¹ MCF7 qui nécessitent la présence d'agonistes aux récepteurs d'œstrogène pour proliférer. En mesurant le taux de prolifération de ces cellules, ils ont montré que l' α -zéaralénol a une activité oestrogénique relative 92 fois supérieure à celle de la zéaralénone alors que l'activité oestrogénique relative du β -zéaralénol est seulement de 0,44 par rapport à celle de la ZEN (Tableau I.6). C'est pourquoi la conversion de zéaralénone en α -zéaralénol doit être vue comme une réaction de bioactivation, alors la conversion en β -zéaralénol reflète plus une inactivation du composé parent.

¹ Cellules cancéreuses (gr. adèn : glande; karkinos : crabe; -ome: tumeur)

Tableau I.6: EC₅₀ (nM) de la ZEN et de ses métabolites pour la prolifération des cellules MCF7 (Shier *et al.*, 2001) et IC₅₀ pour les affinités aux récepteurs oestrogéniques ER- α et ER- β (Takemura *et al.*, 2007).

	EC ₅₀ prolifération MCF7 (nM) (Shier <i>et al.</i> , 2001)	IC ₅₀ liaison ER- α (nM) (Takemura <i>et al.</i> , 2007)	IC ₅₀ liaison ER- β (nM) (Takemura <i>et al.</i> , 2007)
E ₂		10,35	10,04
ZEN	1,1	240,4	165,7
α -ZOL	0,012	21,79	42,76
β -ZOL	2,5		
ZAN	0,44		
α -ZAL	0,060		
β -ZAL	0,31		

Puisque les effets biologiques des œstrogènes dans des tissus cibles dépendent de la présence des récepteurs oestrogéniques, les caractéristiques de complexation de la ZEN à de tels récepteurs ont été étudiées : la ZEN se lie et active ER α et ER β dans des cellules humaines transfectées avec ER α et ER β . Pour ER α , la ZEN s'est avérée être un plein agoniste et pour ER β un agoniste partiel (Kuiper *et al.*, 1998). En effet, la lipophilie de la ZEN lui permet de traverser les membranes cellulaires et de se fixer aux récepteurs oestrogéniques cytosoliques. Le complexe alors formé est transloqué dans le noyau où il se lie à des éléments de réponse des gènes cibles (Riley, 1998). Les deux récepteurs oestrogéniques sensibles à la ZEN, ER- α et ER- β , diffèrent au niveau du domaine C-terminal, site de liaison du ligand, et du domaine N-terminal de transactivation (Kuiper *et al.*, 1998).

L'affinité la plus basse aux récepteurs oestrogéniques de rongeur a été trouvée pour le β -ZOL (Celius *et al.*, 1999; Shier *et al.*, 2001). Les affinités relatives aux récepteurs cytoplasmiques utérins de rat pour la ZEN et ses dérivés sont classées comme suit : α -zearalanol > α -zearalenol > β -zearalanol > ZEN > β -zearalenol (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; Eriksen et Alexander, 1998). Ces réactions de réduction concurrencent dans l'intestin et le foie des réactions de conjugaison, en particulier après une ingestion orale de la toxine via des aliments.

Par ailleurs, la ZEN est également capable d'inhiber la synthèse d'ADN et de protéines. De plus, sur des cellules rénales de singe et des cellules issues d'un adénocarcinome colorectal humain, la ZEN a induit la peroxydation des lipides de manière dose-dépendante. L'effet

clastogène¹ de la ZEN par induction de la peroxydation des lipides pourrait être relié à sa capacité à perturber le cycle cellulaire et à provoquer l'apoptose (Abid-Essefi *et al.*, 2004). Néanmoins, aucun effet tératogène de la ZEN n'a été reporté (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; JECFA, 2000).

I-1.4.6. Valeurs toxicologiques de référence

Le Scientific Committee on Food (2000) a établi en 2000, une dose journalière tolérable temporaire de 0,2 µg/kg p.c basée sur une étude à court terme chez le porc (No Observed Adverse Effect Level – NOAEL- de 40 µg/kg p.c./j. effets hormonaux. facteur sécurité = 200). Le comité du Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) a établi en 1999 une dose journalière maximale tolérable provisoire de 0,5 µg/kg de poids corporel calculée à partir des effets hormonaux observés chez l'espèce la plus sensible, le porc (NOAEL de 50 µg/kg de poids corporel par jour). Le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) a proposé en 1999 une Dose Journalière Tolérable (DJT) de 100 mg/kg p.c. /j calculée à partir d'effets observés sur la reproduction du singe (INRA, 2004).

Le comité expert commun de la FAO et de l'OMS sur les additifs alimentaires (JECFA) a estimé le taux maximum de résidus dans le foie de 10 µg/kg et dans les muscles de 2 µg/kg. Récemment la Food and Drug Administration (FDA) a établi des niveaux de sécurité de concentration pour les résidus totaux de l' α -zéaralénol dans les tissus de bétail comestibles non cuisinés avec des valeurs allant jusqu'à 150 µg/kg dans les muscles, 300 µg/kg dans le foie, 450 µg/kg dans les reins et 600 µg/kg dans la graisse (Tableau I.7).

La zéaralénone a été évaluée par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 1993 qui l'a classée dans le groupe 3 (données insuffisantes chez l'animal et chez l'homme pour statuer sur sa cancérogénicité). Le JECFA a fixé en 1999 une Dose Journalière Tolérable Provisoire (DJTP) égale à 0,5 µg/kg p.c./j sur la base d'une étude toxicologique réalisée sur le porc pendant 15 jours. L'effet toxique pertinent retenu est l'existence d'effet oestrogénique. La dose sans effet déduite de cette étude est égale à 40 µg/kg p.c./j. Le JECFA a considéré qu'un facteur de sécurité de 100 était suffisant au vu de la Low Observed Adverse Effect Level (LOAEL) de cette étude (200 µg/kg p.c./j) et de la DJT affectée à l'un des métabolites de la zéaralénone, l' α -zéaralanol utilisé comme médicament vétérinaire (interdit en Europe). Le

¹ Qui provoque des cassures.

SCF a fixé en 2000, une DJTP égale à 0,2 µg/kg p.c./j sur la base de la même étude et des mêmes effets. Le facteur de sécurité appliqué est égal à 200 en raison du petit nombre d'études toxicologiques disponibles (AFSSA, 2006).

Tableau I.7 : Teneurs maximales en zéaralénone dans les denrées alimentaires exprimées en µg/kg. (Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA 2006).

Produit	Teneur maximale en µg/kg
Céréales brutes autres que le maïs	100
Maïs brut	200
Céréales destinées à la consommation humaine directe, farine de céréales, son et germe (à l'exception des préparations à base de maïs)	75
Maïs destiné à la consommation humaine directe, farine de maïs, maïs moulu, gruau de maïs et huile de maïs raffinée	200
Pain, pâtisseries, biscuits (à l'exception des préparations à base de maïs)	50
Collations au maïs et céréales pour petit déjeuner à base de maïs	50
Autres collations à base de céréales et céréales pour petit déjeuner	50
Préparations à base de maïs destinées aux nourrissons et enfants en bas âge	20
Autres préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	20

I-2. L'acide mycophénolique

I-2.1. Production et activité thérapeutique

L'acide mycophénolique (AMP), produit de fermentation de plusieurs souches de *Penicillium* (Bullingham *et al.*, 1998) mais aussi de *Byssoschlamys nivea* (Puel *et al.*, 2005), possède des propriétés immunosuppressives mises à profit en transplantation d'organe. Deux formes médicamenteuses ont été développées pour améliorer la biodisponibilité de ce produit. La première forme mise sur le marché est le mycophénolate mofétil (MMF, Cellcept®) ou morpholinoéthyl-ester de l'AMP (Figure I.4). Après administration orale, cette pro-drogue est rapidement hydrolysée en AMP dans le tube digestif et absorbée dans l'estomac. Récemment, une formulation gastro-résistante (comprimés pelliculés) du mycophénolate sodique (Figure I.4) (Myfortic®) a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM). Après administration orale, l'enrobage gastro-résistant du principe actif permet la libération et l'absorption du mycophénolate dans l'intestin grêle et non dans l'estomac.

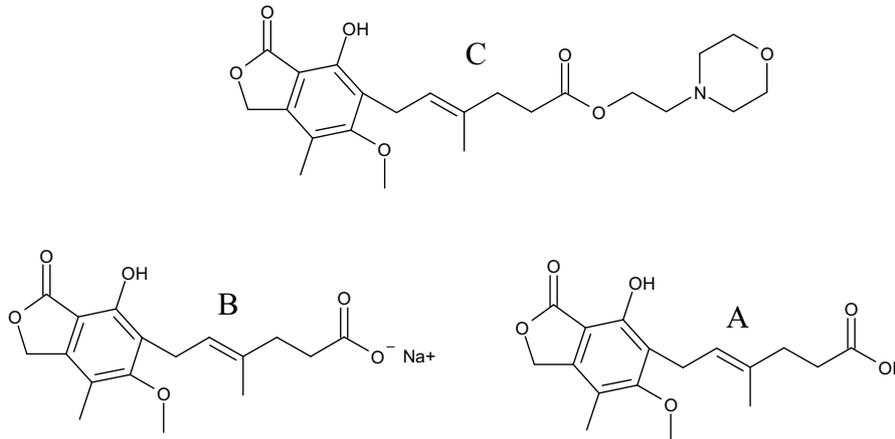


Figure I.4 : Formules de l'acide mycophénolique (AMP) (A), du mycophénolate sodique (B) et du mycophénolate mofétil (MMF) (C).

I-2.2. Absorption et distribution

Après administration orale, le MMF est rapidement et massivement absorbé. Il subit une hydrolyse précoce et complète en AMP (substance active) par désestérification dans le tube digestif ; le MMF n'est pas mesurable dans le plasma après une administration orale (Fulton et Markham, 1996; Bullingham *et al.*, 1998). La biodisponibilité totale moyenne de l'AMP, évaluée chez 12 volontaires sains par le ratio des aires sous la courbe (AUC) obtenues après administrations orale et intraveineuse de MMF, a été estimée à 94,1% ($\pm 16,2\%$) (Bullingham *et al.*, 1996). Dans le sang, l'AMP est contenu à 99,9% dans le plasma (Nowak et Shaw, 1995), ce qui fait du plasma le milieu de choix pour le dosage de l'AMP. Chez 12 volontaires sains, son volume apparent de distribution moyen était de 3,6 L/kg (Fulton et Markham, 1996).

L'AMP est fortement lié aux protéines plasmatiques et plus particulièrement à l'albumine. Aux concentrations plasmatiques usuelles d'AMP, le taux de fixation protéique moyen est de 97,5% (Shaw *et al.*, 1995; Bullingham *et al.*, 1996; Fulton et Markham, 1996; Bullingham *et al.*, 1998).

I-2.3. Métabolisme et excrétion

Le métabolisme de l'AMP est essentiellement hépatique et rénal et il implique des mécanismes de phases I et II (Figure I.5 ; *cf* partie II de ce chapitre). Le métabolisme de phase I, minoritaire, fait intervenir un cytochrome P450 (principalement les isoformes CYP 3A et 2C) pour donner un métabolite M3 (Shipkova *et al.*, 1999) récemment identifié par Picard et al. (Picard *et al.*, 2004) comme étant le 6-O-desméthyl de l'AMP. Ce métabolite serait

secondairement glucuro-conjugué. L'AMP est principalement métabolisé par des mécanismes de phase II impliquant deux types d'enzymes :

- les UDP-glucuronosyl-transférases, qui catalysent la formation de l'AMP- β -phényl-glucuronide (Bullingham *et al.*, 1998) (ou AMPG ; métabolite majoritaire inactif, fixé à l'albumine à 82%) et de l'AMP-acyl-glucuronide (ou AMPaG ; métabolite minoritaire actif (Schutz *et al.*, 1999; Shipkova *et al.*, 2002))
- les UDP-glucosyl-transférases, qui catalysent la formation de l'AMP- β -phényl-glucoside (inactif) (Schutz *et al.*, 1999) et d'un autre glucoside de l'AMP, supposé être l'AMP-acyl-glucoside. L'activité de ce dernier n'a fait l'objet d'aucune publication.

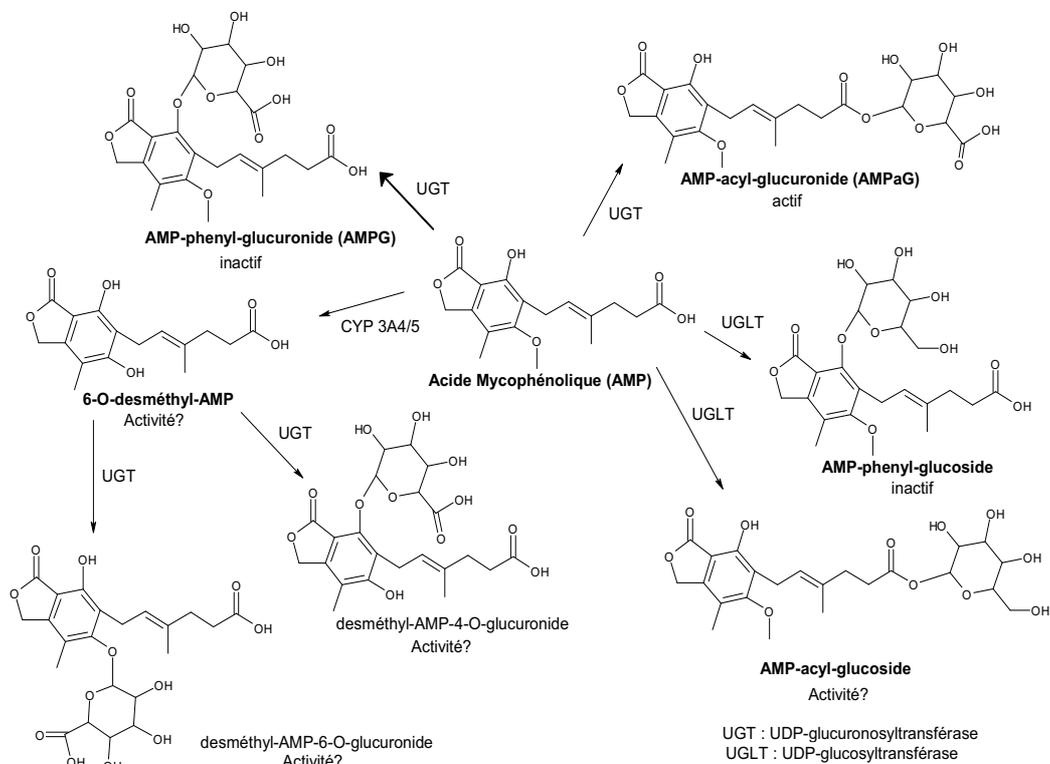


Figure I.5: Voies métaboliques de l'AMP. D'après (Shipkova *et al.*, 1999; Picard *et al.*, 2004).

Aucune donnée concernant des interactions possibles drogue-drogue entraînant des variations de concentration de l'AMPaG actif, potentiellement toxique, n'est disponible. Une meilleure connaissance des voies métaboliques de l'acide mycophénolique est nécessaire pour étudier mieux de telles interactions. Jusqu'ici, au moins 15 formes d'UDP-glucuronosyl-transférases (UGT) ont été identifiées chez l'homme. D'après des similitudes de séquence, elles ont été divisées en deux familles, UGT 1 et UGT 2. Les isoformes UGT impliquées dans la glucuronidation de l'acide mycophénolique en AMPG ont déjà été étudiées par plusieurs

équipes : Morissette *et al.* ont démontré que la glucuronidation de l'acide mycophénolique en AMPG est plus efficace chez les hommes que chez les femmes, suggérant ainsi que l'acide mycophénolique pourrait entrer en compétition avec des œstrogènes pour l'UGT 1A (Morissette *et al.*, 2001). Plus récemment, une méthode de LC-MS/MS permettant l'identification et la détermination des métabolites de l'acide mycophénolique a été développée par Picard *et al.* (Picard *et al.*, 2004). Les métabolites ont été caractérisés dans des échantillons d'urine et de plasma provenant de patients greffés rénaux suivant un traitement à base de mycophénolate de mofetil et provenant d'incubations *in vitro* d'acide mycophénolique avec des microsomes humains de foie (HLM), de rein (HKM) ou des microsomes humains intestinaux (HIM). Les isoformes d'UGT impliquées dans la production de l'AMPG ou de l'AMPaG ont été étudiées :

- en utilisant des microsomes induits de foie de rat exprimant chaque UGT de manière hétérologue (Supersomes®) ;
- par inhibition sélective chimique des activités métaboliques des HLM, HKM et HIM.

Les trois préparations microsomales produisent de l'AMPG, de l'AMPaG et deux glucosides de mycophénolate. Parmi les 10 isoformes UGT examinées, l'UGT 1A9 est la plus efficace pour la synthèse de l'AMPG avec un k_M de 0,16 mM, proche de celui déterminé pour HLM (0,18 mM). D'après les expériences d'inhibition chimiques, l'UGT 1A9 est apparemment responsable de 55 %, de 75 % et de 50 % de production d'AMPG respectivement dans le foie, le rein et le mucus intestinal. Bien que l'UGT 2B7 ait été la seule isoforme produisant l'AMPaG en quantité significative, l'azidothymidine, inhibiteur sélectif a seulement modérément réduit cette production (approximativement -25%). En conclusion, les UGT 1A9 et 2B7 ont été clairement identifiées comme les principales isoformes impliquées dans la glucuronidation de l'acide mycophénolique, vraisemblablement en raison de leur expression hépatique et rénale élevée (Picard *et al.*, 2004).

En outre, deux autres métabolites, AMP-acyl-glucuronide (AMPaG) et AMP-phényl-glucoside (AMPGIs), ont été isolés dans le plasma de patients greffés rénaux et identifiés par spectrométrie de masse en tandem (Schutz *et al.*, 1999; Shipkova *et al.*, 1999). Un rapport récent a démontré que l'AMPaG a un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes *in vitro* (Shipkova *et al.*, 2001). Par ailleurs la toxicité de l'acyle-glucuronide est bien connue (Ritter, 2000; Shipkova *et al.*, 2003) : tous deux peuvent se lier covalamment aux protéines et à d'autres macromolécules, ce qui pourrait être à l'origine du mécanisme de leur immunogénicité et de leur toxicité (Wieland *et al.*, 2000).

Les métabolites glucuro-conjugués et gluco-conjugués sont excrétés par voie biliaire. Dans l'intestin, l'AMPG est partiellement déconjugué par la flore bactérienne et réabsorbé sous forme d'AMP, donnant lieu à un cycle entérohépatique se traduisant par un rebond sur les courbes des concentrations en fonction du temps (Bullingham *et al.*, 1998). Le cycle entérohépatique a été étudié au moyen de la cholestyramine, substance qui exerce son action thérapeutique en se fixant de manière non spécifique aux acides biliaires, ainsi qu'aux médicaments acides ou aux métabolites conjugués. L'administration de cholestyramine chez des volontaires sains recevant oralement une dose unique de MMF provoquait une diminution moyenne de la valeur de l'AUC d'AMP totale de 37% (10 à 61%, n=12), ce qui témoignait de l'importance de la contribution du cycle entérohépatique dans la pharmacocinétique (PK) de l'AMP (Bullingham *et al.*, 1998). La valeur de l'AUC est la résultante du métabolisme hépatique de l'AMP et de son cycle entérohépatique. Ces processus peuvent être plus ou moins affectés au cours de certaines pathologies, faisant ainsi varier la biodisponibilité apparente totale du médicament. 93% de la dose de MMF administrée est éliminée par voie urinaire, majoritairement sous forme d'AMPG et minoritairement sous forme d'AMP et d'AMPaG, par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. 6% de la dose est éliminée dans les *féces*.

II. Métabolisme, détoxification et transport

Le métabolisme d'un xénobiotique (médicament, pesticide polluant, toxique, contaminant alimentaire, mycotoxine, etc.) correspond à la transformation par une réaction enzymatique de ce dernier en un ou plusieurs composés, dits métabolites qui peuvent être actifs ou inactifs pharmacologiquement et parfois toxiques.

Le métabolisme est une des phases de l'élimination d'un composé exogène : les différentes étapes du métabolisme conduisent à la formation de substances hydrosolubles plus facilement éliminées par les milieux aqueux que sont les urines, la bile, la salive ou la sueur. Il est important de noter que ce phénomène peut être mis à profit d'un point de vue pharmacologique. Ainsi le métabolisme d'un médicament n'aboutit pas forcément à son inactivation : les prodrogues (ou promédicaments) pharmacologiquement inactifs sont rapidement métabolisés en métabolites actifs.

De nombreux tissus sont le siège du métabolisme des xénobiotiques : foie, rein, poumon, intestin...Le principal étant le foie : les hépatocytes sont riches en enzymes impliquées dans le métabolisme.

On distingue 2 grandes phases dans le métabolisme :

- les réactions de phase I
- les réactions de phase II

Les réactions dites de phase III sont assimilées à des phénomènes d'efflux du composé parent introduit dans la cellule ou de ses métabolites formés au cours des deux précédentes phases (Figure I.6).

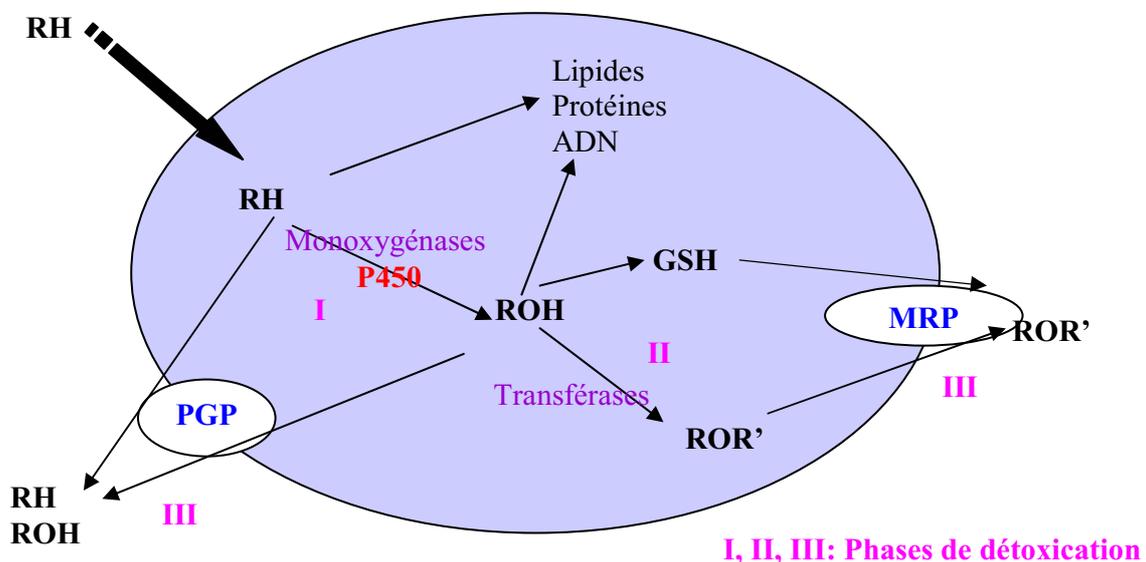


Figure I.6: Schéma d'une cellule, siège des processus de détoxification de phase I, II et III.

RH est un composé exogène subissant des réactions de phase I par l'intermédiaire de mono-oxygénases (par exemple un P450) pour donner un composé de type ROH, qui pourra être pris en charge par des transférases (UGT par exemple) au cours de la phase II de détoxification. Le composé parent, comme les métabolites successifs, peuvent être expulsés de la cellule par des protéines de transport (PgP ou MRP) au cours de la phase III.

II-1. Phase I

II-1.1. Mécanisme d'action

La phase I est l'étape qui conduit à la formation de métabolites qui peuvent soit être éliminés par prise en charge par les transporteurs actifs s'ils ont atteint un degré d'hydrosolubilité suffisant, soit poursuivre les processus de métabolisation par la phase II. La phase I n'est pas obligatoire : certains composés peuvent subir immédiatement la phase II.

Les réactions de phase I sont des réactions :

- d'oxydation : qui impliquent des mono-oxygénases telles que les cytochromes P450. Elles ont essentiellement lieu au niveau des microsomes hépatiques ;
- de réduction, moins fréquentes ;
- d'hydrolyse : qui ont lieu au niveau des organes (rein, foie, intestin, poumon..) mais aussi au niveau du plasma. Les estérases impliquées dans les réactions d'hydrolyse ne sont pas spécifiques.

Les métabolites formés par les réactions de phase I ont des groupes fonctionnels hydroxyles (OH), amines (NH₂) ou carboxyles (COOH) qui peuvent ensuite être conjugués par les réactions de phases II (Figure I.7).

II-1.2. Les cytochromes P450s

Sous ce terme général de cytochrome P450, se regroupe une superfamille multigénique d'oxygénases enzymatiques dites «hemo-thiolate» à propriétés redox. Aussi connu sous le terme de mono-oxygénases, le cytochrome P450 a la capacité d'activer les molécules de dioxygène en des entités hautement réactives (ROS) et d'insérer ensuite l'oxygène moléculaire dans un nombre important et varié de substrats tant au niveau d'un atome de carbone, que d'azote ou de soufre. Cette activation du dioxygène est rendue possible par la présence d'un atome de fer inclus dans l'hème qu'il porte. Ces cytochromes P450 (CYPs ou P450s) sont des enzymes ubiquitaires que l'on retrouve dans tous les organismes vivants à l'exception de certains micro-organismes primitifs qui auraient évolué il y a plus de 3,5 milliards d'années. Les CYPs catalysent ainsi des réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et du NADPH.

La nature des substrats et les réactions générées par ces enzymes sont multiples et variées : les CYPs sont responsables du métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines D, prostanoïdes, alkanoïdes, terpènes et autres phytoalexines...) que les xénobiotiques (médicaments, pesticides polluants, toxiques, cancérigènes...). Les réactions de biotransformation des xénobiotiques catalysées par les CYPs s'inscrivent en effet dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. Ce sont d'ailleurs ces mêmes substrats qui auto induisent leurs propres réactions de détoxification. Les CYPs peuvent parfois catalyser l'activation chimique de certains

composés (procarcinogènes...) et produire des métabolites toxiques, mutagènes voire cancérogènes (génération de ROS qui endommagent l'ADN).

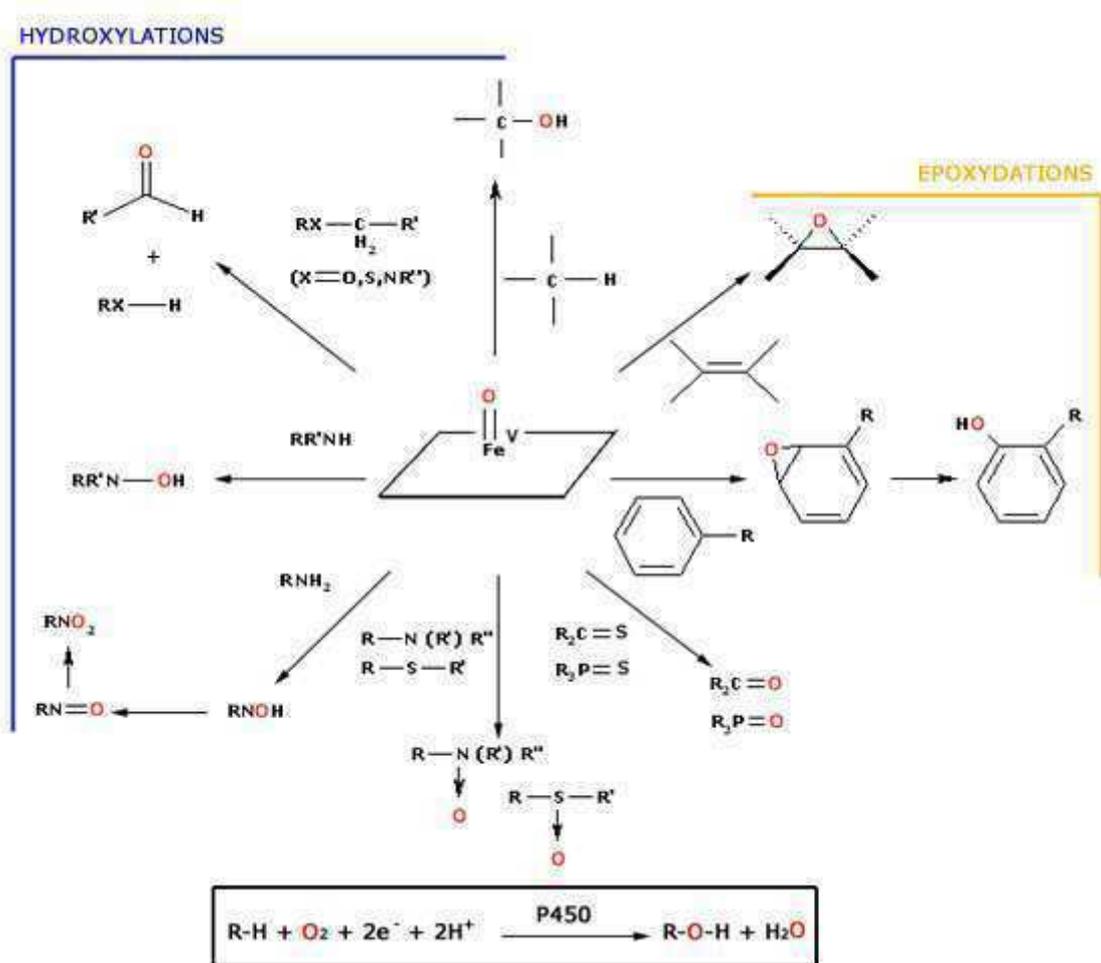


Figure I.7 : Réactions d'oxydation généralement catalysées par les P450s. D'après (Mansuy et Battioni, 1999).

Il y a une cinquantaine d'années, Garfinkel et Klingenberg ont reporté pour la première fois l'apparition d'un pigment jaune orangé dans des fractions microsomales hépatiques de rat et de cochon en présence de monoxyde de carbone (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Ce pigment fut alors dans un premier temps caractérisé comme une hémoprotéine, identifiée à un cytochrome de type *b* peu commun, puis deviendra plus tard ce que l'on connaît sous la désignation « P450 ». Cette désignation de « P450 » a été attribuée en raison de sa propriété d'absorption maximale à 450 nm dans le spectre UV-visible lorsque le fer de l'hème, à l'état réduit, est complexé au monoxyde de carbone (Omura et Sato, 1962). Le 'P' de P450 fait référence quant à lui au « pigment » d'où le terme P450 pour Pigment à 450 nm. Depuis, ce

système enzymatique a été l'objet de nombreuses recherches et est encore au cœur de nombreux projets scientifiques aujourd'hui.

Il existe un grand nombre d'isoenzymes du cytochrome P450 (57 isoenzymes identifiées en 2004 chez l'Homme), Figure I.8. Les cytochromes P450 sont présents dans le foie dans les microsomes hépatiques mais aussi dans l'intestin, le rein, les poumons, la peau, etc.

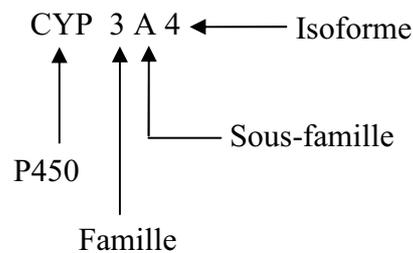


Figure I.8 : Nomenclature des P450s

Enfin, tous les P450s identifiés à ce jour désignent des hémoprotéines constituées d'un hème relié à l'apoprotéine par un groupement cystéinate complexant le fer de groupe prosthétique (Figure I.9). Schématiquement, on a coutume de représenter les CYPs comme une grosse hémoprotéine constituée d'une chaîne polypeptidique unique, l'*apoprotéine* (d'un poids moléculaire compris entre 45 et 60 kDa) et d'un groupement prosthétique central, l'*hème* (catalyseur de la réaction enzymatique). Ce dernier est lié de façon « non covalente » à l'apoprotéine par l'intermédiaire d'une cystéine. Le site catalytique de l'enzyme est hydrophobe, permettant l'accueil de substrats.

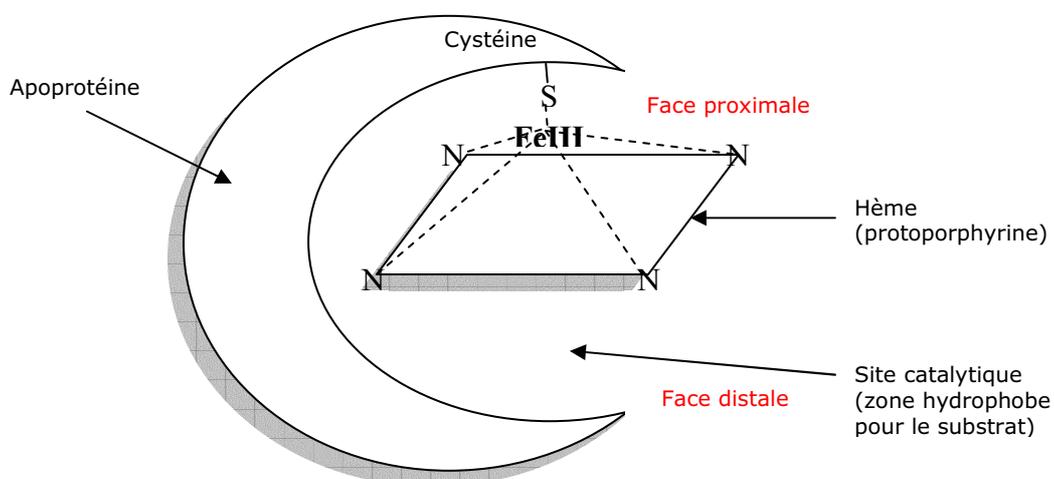


Figure I.9 : Représentation schématique d'un CYP (d'après la thèse de Thien-An Nguyen (Nguyen, 2007))

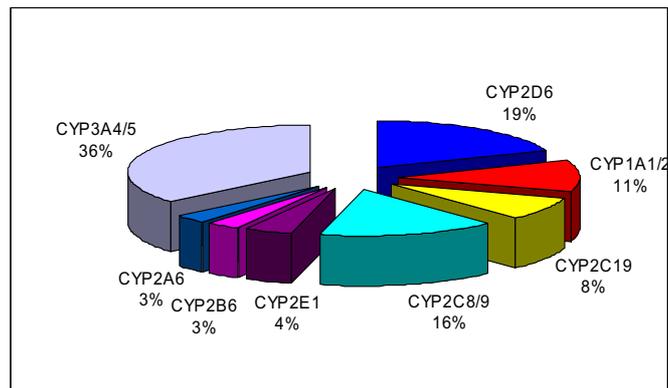


Figure I.10: Répartition des médicaments métabolisés par différentes isoformes de CYPs humains (Wrighton et Stevens, 1992).

Les isoenzymes du cytochrome P450 peuvent être inhibées ou induites par des xénobiotiques ou des aliments ce qui peut provoquer des interactions médicamenteuses.

Certains substrats, inducteurs enzymatiques sont capables d'augmenter la synthèse des cytochromes P450 et par conséquent leur activité enzymatique. On parle d'induction enzymatique. L'effet inducteur est peu spécifique. Un inducteur peut augmenter la synthèse et l'activité enzymatique d'une ou plusieurs isoformes des CYPs, par exemple le phénobarbital induit la synthèse des CYP3A et CYP2B6, la rifampicine est un inducteur des CYP3A et 2C9. Les principaux inducteurs enzymatiques des CYPs sont présentés dans le Tableau I.8 ci-après. Les plus puissants inducteurs enzymatiques sont certains anti-épileptiques (phénobarbital, carbamazépine, phénytoïne) et la rifampicine. Le Millepertuis (herbe de Saint Jean ou *St John's wort* ou *Hypericum perforatum*), plante médicinale utilisée dans le traitement des troubles de l'humeur (anxiété, dépression) est un inducteur enzymatique des CYPs, qui coadministré avec des médicaments à faible marge thérapeutique et métabolisés par les CYPs (ex : ciclosporine, théophylline, anti vitamine K...) entraîne une diminution des concentrations thérapeutiques et donc de leurs effets.

L'effet inducteur se manifeste :

- sur le propre métabolisme de l'inducteur : on parle d'auto-induction, le métabolisme de l'inducteur est augmenté, la posologie devra être secondairement ajustée ;
- sur d'autres médicaments en cas de co-administration : le métabolisme d'autres médicaments métabolisés par le ou les CYPs induits est augmenté, ce qui se traduit le plus souvent par une diminution de la concentration plasmatique du produit actif et une diminution de sa demi-vie, d'où une diminution d'activité du médicament.

L'inhibition des cytochromes P450 par certains médicaments ou aliments dits inhibiteurs enzymatiques est un autre facteur de variation du métabolisme. L'inhibition est le plus souvent compétitive et se manifeste rapidement avec une augmentation de la concentration plasmatique et demi-vie du médicament dont le métabolisme a été inhibé avec un risque de toxicité. L'inhibition enzymatique est fréquemment à l'origine d'interactions médicamenteuses. Les principaux inhibiteurs enzymatiques (kétoconazole, macrolides, ritonavir, jus de pamplemousse...) sont présentés dans le Tableau I.8.

Remarque : deux médicaments métabolisés par la même isoforme de CYP sans être inducteur ou inhibiteur enzymatique mais en étant seulement substrats de la même isoenzyme, entreront en compétition avec un risque de diminution de leur métabolisme.

Tableau I.8 : Principaux substrats, inducteurs et inhibiteurs des CYPs (Livret des Interactions médicamenteuses Vidal® 2003)

	Substrats	Inhibiteurs	Inducteurs
CYP1A2	Caféine, imipramine, paracétamol, théophylline	Cimétidine, quinolones (ciprofloxacine, énoxacine, norfloxacine), fluvoxamine	Fumée de cigarettes, oméprazole
CYP2C9	Antiinflammatoires non stéroïdiens, phénytoïne, tolbutamide, S-warfarine		Barbituriques, rifampicine
CYP2C19	Citalopram, diazépam, imipramine, oméprazole, proguanil, propranolol		Barbituriques, rifampicine
CYP2D6	Antiarythmiques: flécaïnide, propafénone Antidépresseurs: amitriptyline, clomipramine, désipramine, imipramine, nortriptyline, paroxétine Antitussifs: codéine, dextrométhorphan β-bloquants: alprénolol, métoprolol, propranolol, timolol Neuroleptiques: halopéridol, perphénazine, rispéridone, thioridazine, zuclopenthixol	Cimétidine, fluoxétine, paroxétine, quinidine, ritonavir	
CYP3A4	Antagonistes du calcium: diltiazem, félodipine, nifédipine, vérapamil Antiarythmiques: amiodarone, disopyramide, lidocaïne, quinidine, propafénone Benzodiazépines: alprazolam, diazépam, midazolam, triazolam. Médicaments antiinfectieux: érythromycine, itraconazole, kétoconazole Statines: atorvastatine, simvastatine Divers: carbamazépine, ciclosporine, dextrométhorphan, digitoxine, éthinyloestradiol, éthosuximide, imipramine, terféndine	Cimétidine, clarithromycine, érythromycine, itraconazole, kétoconazole, ritonavir	Carbamazépine, dexaméthasone, phénobarbital, phénytoïne, rifampicine

II-2. Phase II : Conjugaison

La phase II est une phase de conjugaison qui aboutit à la formation de substances conjuguées, hydrosolubles et facilement éliminées par les urines ou la bile. Les métabolites ou les composés parents, subissent différentes réactions de conjugaison : glycu- (ou glucuro ou glucurono) conjugaison ; sulfo-conjugaison ; acétylation ; alcoylation (transfert d'un groupement méthyl) pour donner un produit conjugué qui sera éliminé. La conjugaison est le transfert sur un groupe fonctionnel (OH, NH₂, COOH) d'un composé de type sulfate, glucoronide, méthyl (Figure I.11)...

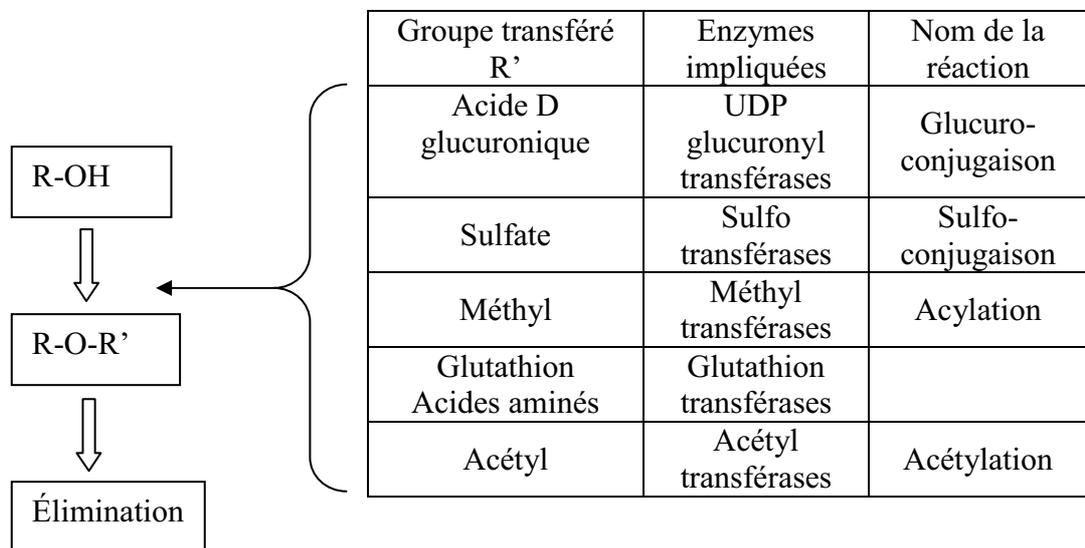


Figure I.11 : Principaux groupes fonctionnels transférés à un composé de type R-OH (produit de la réaction de phase I du xénobiotique R-H), lors d'une réaction de phase II, dite de conjugaison par des enzymes de la famille des transférases.

II-3. Transport

Pour pénétrer dans l'organisme (par voie orale, pulmonaire, intra-veineuse, dermique etc.), les xénobiotiques vont se voir confrontés à des barrières cellulaires à franchir afin d'être transportés jusqu'à un organe cible ou un tissu cible. Plusieurs types de barrières existent : pulmonaire, gastrique, intestinale, cutanée etc. Nous nous limiterons ici à la barrière intestinale, dans la mesure où les mycotoxines auxquelles nous nous sommes intéressés (ZEN et AMP) sont majoritairement absorbées au niveau de l'intestin grêle : la ZEN est absorbée plus précisément au niveau du jéjunum, au début de l'intestin grêle (Avantaggiato *et al.*, 2003).

Chez l'homme et les mammifères monogastriques, l'intestin grêle représente le site majeur d'exposition aux composés exogènes absorbés par voie orale. Il assure une première barrière contre d'éventuels aliments contaminés qui auraient été ingérés. C'est à ce niveau que s'opèrent le passage et le reflux de toxines dans le sang. Cette barrière épithéliale est donc déterminante dans le passage dans le sang des mycotoxines ingérées. Elle sépare la lumière digestive (milieu extérieur) du milieu intérieur de l'organisme. Son rôle est de contrôler les échanges de substances entre ces deux compartiments en assurant une protection contre la pénétration de composés toxiques absorbés par voie orale. Elle est constituée d'une couche continue de cellules épithéliales connectées entre elles par des jonctions serrées et module ainsi la perméabilité membranaire via un transport paracellulaire (entre les cellules épithéliales) ou transcellulaire (passage au travers des cellules épithéliales).

Compte-tenu de leurs propriétés physico-chimiques et de leur affinité pour les protéines de transport membranaire présentes au niveau de l'épithélium intestinal, les xénobiotiques vont pouvoir emprunter ces différentes voies. Le passage transcellulaire des composés exogènes peut être modifié par le métabolisme intracellulaire.

Les différents modèles d'étude des mécanismes d'absorption des xénobiotiques et la détermination de leur perméabilité membranaire sont des modèles *in silico* (modélisation informatique), *in vitro* (culture de cellules gastro-intestinales de porc, modèle de tractus pulmonaire de porc, etc.), *ex vivo* (intestin) et *in vivo* (chez le rat ou autre animal de laboratoire).

Les approches *in silico* de prédiction de l'absorption de xénobiotiques se basent en partie sur les propriétés physico-chimiques de molécules (taille, lipophilie, solubilité, etc.) et sont souvent utilisées dans le screening de nouveaux médicaments (Smith *et al.*, 2001). Elles sont en effet, rapides, peu coûteuses, reproductibles et automatisables. Cependant, si elles rendent bien compte des processus de transport actif, elles ne permettent pas d'intégrer de possibles interactions multifactorielles (Deferme *et al.*, 2008). En revanche, les méthodes utilisant des cultures cellulaires ou les modèles animaux, permettent d'étudier les mécanismes d'absorption passifs et actifs pouvant impliquer des transporteurs membranaires. Ces derniers, sont classés en deux grandes familles de transporteurs : la famille des transporteurs « ATP-binding cassette » (ABC) qui compte 48 membres et la famille des transporteurs « solute carrier » (SLC) qui compte plus de 300 membres chez les mammifères. Au niveau intestinal, 8 transporteurs de la superfamille SLC et 7 des ABC ont un rôle connu dans le transport intestinal des xénobiotiques (Sai et Tsuji, 2004).

Dans le but de déterminer les modalités du transfert transépithélial des xénobiotiques, différents types cellulaires d'origine intestinale ou rénale sont utilisés pour leur capacité à former un épithélium polarisé en culture. Parmi eux, la lignée Caco-2 présente un certain nombre d'avantages, parmi lesquels sa différenciation spontanée sous certaines conditions de culture, en cellules de type entérocytaire (Pinto *et al.*, 1983). Elle est issue d'un adénocarcinome colorectal humain et a été établie pour l'étude des mécanismes de cancérogénèse et les thérapies cytostatiques (Fogh *et al.*, 1977).

Cultivées sur filtre, les cellules Caco-2 sont largement utilisées dans l'élucidation des mécanismes mis en jeu dans l'absorption de xénobiotiques (Artursson et Karlsson, 1991) et le screening de nouveaux médicaments (Shah *et al.*, 2006). La différenciation des cellules cancéreuses coliques humaines en culture définit leur capacité à s'organiser morphologiquement comme des cellules entérocytaires et à exprimer les caractéristiques fonctionnelles de l'épithélium intestinal normal.

III. Les standards internes et l'enrichissement isotopique

L'étude et le dosage de composés naturels en faibles doses posent plusieurs problèmes expérimentaux de par la complexité des échantillons, la diversité des matrices, la stabilité des composés etc. Afin de faire face à ces difficultés, plusieurs solutions existent :

- l'utilisation de standards externes (molécule rajoutée au moment de l'analyse, après les étapes d'extraction et/ou de purification) ;
- l'utilisation de standards internes (molécule chimiquement proche de l'analyte et rajoutée dans l'échantillon brut avant tout traitement) ;
- l'utilisation de courbes d'étalonnage avec un standard de l'analyte.

L'utilisation d'un standard interne nécessite qu'il réponde à un certain nombre de propriétés telles qu'un comportement physico-chimique proche de celui de l'analyte, qu'il soit analysable dans les mêmes conditions ou qu'il n'y ait pas d'interférence de signal analytique avec l'analyte ni de réaction avec ce dernier.

L'origine des analyses grâce à des standards internes enrichis en isotopes remonte au début du XX^e siècle, quand (Soddy, 1913) a découvert l'existence des isotopes et que George Hevesy a utilisé les isotopes radioactifs pour déterminer la teneur en plomb dans des roches et la solubilité des sels de plomb dans l'eau (Hevesy et Paneth, 1913). La plupart des éléments ont des isotopes stables et des isotopes radioactifs. Par exemple, le carbone naturel se compose de

^{12}C (98%), de ^{13}C (1,08%) et de ^{14}C radioactif. Bien qu'ayant des propriétés très semblables, les composés contenant ces isotopes peuvent être enrichis ou appauvris en raison de leur différence de masses. Si un élément ou un composé ayant une distribution isotopique naturelle est mélangé à un composé de composition isotopique différente (Figure I.12), deux masses distinctes apparaîtront sur un spectre de masse, alors que les modifications des autres propriétés physico-chimiques seront faibles ou difficilement détectables (sauf IR).

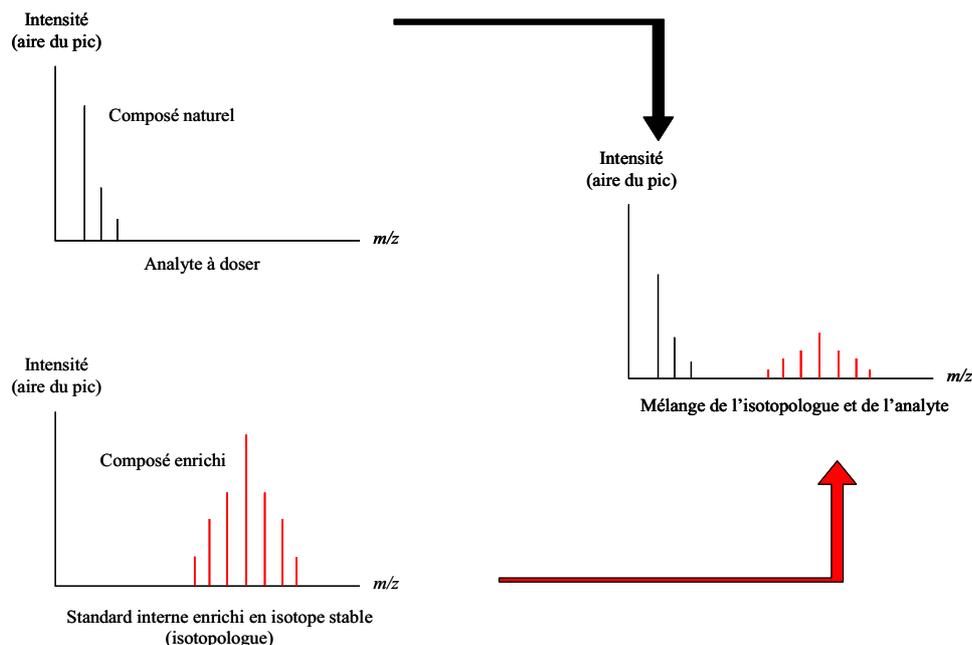


Figure I.12 : Analyses par ajout d'un standard interne uniformément enrichi en isotopes stables. Le standard interne a une distribution isotopique différente de la distribution isotopique naturelle de l'analyte.

Après l'addition du standard marqué et de son équilibration avec l'analyte (composé à analyser ou à doser), le rapport (les proportions relatives) des isotopologues¹ est stable en raison de leurs propriétés chimiques et physiques proches. La spectrométrie de masse permet la différenciation entre les isotopologues et, avec la quantité connue du standard interne, la teneur de l'analyte peut être calculée.

En revanche, un standard interne structurellement différent (ce qui est encore largement utilisé) aura des propriétés distinctes et, par conséquent, peut être à l'origine d'erreurs ou d'imprécisions. En effet, un standard présentant des propriétés physico-chimiques voisines de celles de l'analyte pourra par exemple avoir un comportement différent vis-à-vis des solvants d'extraction ou un rendement d'ionisation distinct de celui de l'analyte entraînant ainsi des

¹ Isotopologues : composés ayant la même formule brute et la même structure chimique mais des compositions isotopiques différentes, donc des masses différentes.

(faibles) erreurs de quantification. En d'autres termes, des pertes de l'analyte au cours de différentes étapes de purification et/ou d'extraction sont complètement compensées par des pertes identiques de l'isotopologue tandis qu'un standard interne structurellement différent ne sera pas forcément extrait et/ou purifié dans les mêmes proportions et donc, sera moins approprié (Figure I.13).

Ainsi, la compensation idéale des pertes rend l'utilisation d'un isotopologue parfaite pour une série d'applications analytiques et particulièrement pour la quantification de composés à l'état de traces. En effet, les analyses de traces exigent souvent des procédures de purification parfois lourdes à mettre en œuvre dues aux interférences de matrice (chaque matrice devant être vérifiée en suivant un protocole très strict préconisé par différents guidelines¹), qui causent habituellement des pertes de l'analyte. Quand des standards internes structurellement différents sont utilisés, des expériences supplémentaires de récupération et des bilans de matière sont nécessaires, ce qui augmente la charge de travail et multiplie les risques d'erreurs. Souvent les taux de récupération ne sont pas reproductibles, ce qui est une cause additionnelle d'imprécision. Dans tous ces cas, l'utilisation de standards internes enrichis aux isotopes stables offre des avantages significatifs : ils sont appropriés à des dosages quantitatifs sans se soucier des pertes éventuelles qui peuvent avoir lieu au cours d'étapes de purification ou d'extraction. Leur utilisation augmente la spécificité de la détermination.

¹ La caractérisation d'une méthode d'analyse consiste en l'étude d'un certain nombre de critères (appelés critères de performance) tels que la linéarité de réponse de la méthode (linéarité entre le signal détecté et la concentration ou la quantité de l'analyte), les limites de détection et de quantification, la fidélité (répétabilité et reproductibilité), la justesse, le taux de récupération. Les techniques de détermination de l'ensemble de ces critères, et les outils statistiques correspondants, figurent dans une norme Afnor (norme V03-110). Le suivi de cette norme permet d'effectuer ce que l'on appelle une validation interne (c'est-à-dire intralaboratoire) qui convient à la caractérisation d'une méthode d'analyse des mycotoxines.

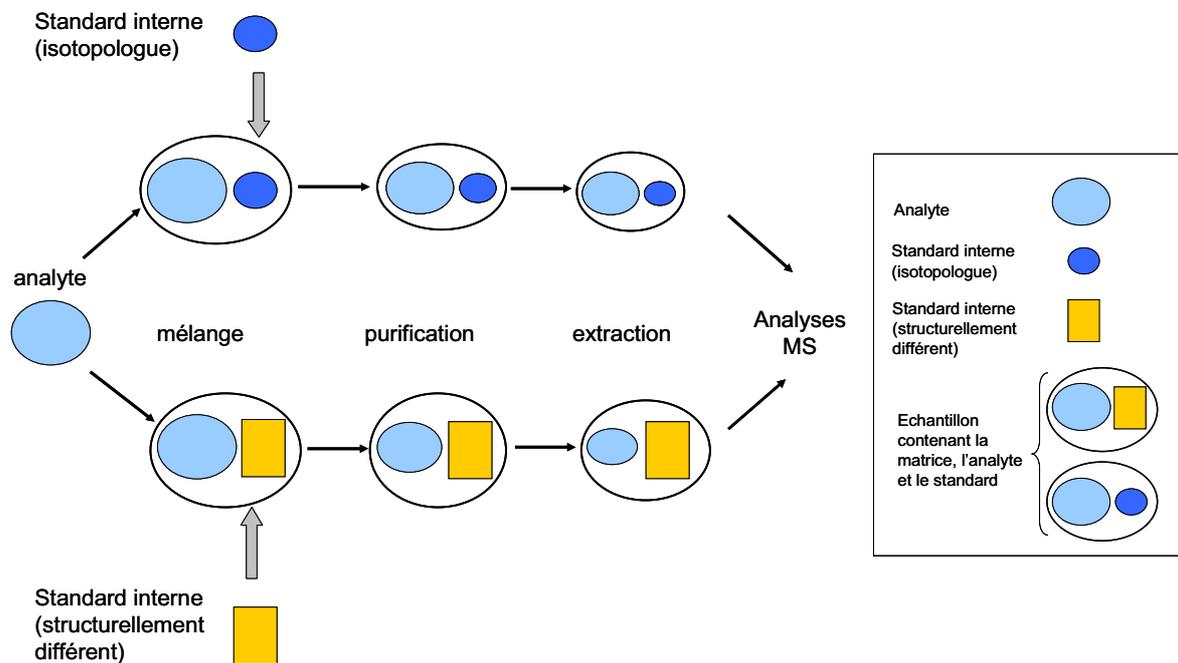


Figure I.13 : Principe d'une analyse quantitative avec un standard interne isotopique. Après addition d'un standard isotopologue à l'analyte, le rapport isotopique demeure stable jusqu'à l'analyse par spectrométrie de masse finale. Au contraire, pour un standard interne structurellement différent, le rapport entre le standard et l'analyte peut changer pendant la préparation ayant pour résultat des erreurs de quantification.

Par ailleurs, il est important que le standard interne et l'analyte puisse se mélanger correctement avant toute étape d'extraction et de purification. En effet, le standard enrichi est ajouté à l'échantillon en solution dans le solvant d'extraction ou directement dans la matrice elle-même. Il sera donc probablement largement récupéré pendant le procédé d'extraction. Pour l'analyte, cela n'est pas nécessairement le cas, puisqu'il peut être emprisonné dans la matrice et être moins extractible par le solvant. Par conséquent, il est nécessaire de respecter un temps de mélange nécessaire pour permettre l'équilibration du standard et de l'analyte et pour s'assurer que le rapport des concentrations de l'analyte et du standard est le même en tout point de la solution ou de l'extrait brut étudié.

En plus de l'information issue des analyses de spectrométrie de masse de l'analyte, le standard interne doit avoir un temps de rétention semblable à celui de l'analyte et plus largement des propriétés chromatographiques proches de celles de l'analyte (polarité, stabilité à une température et sous certaines conditions analytiques, rendement d'ionisation pour un couplage LC-MS, etc.). Par conséquent, le chromatogramme d'un standard interne co-éluant avec les

traces de l'analyte, assure l'attribution correcte du spectre de masse de l'analyte. Les principales caractéristiques nécessaires pour analyser des mycotoxines grâce à un standard interne sont ainsi la possibilité d'un couplage GC-MS ou LC-MS et la disponibilité d'un standard interne enrichi. Ces derniers sont des équipements de base d'un laboratoire de nos jours. Parmi les centaines de mycotoxines découvertes jusqu'ici, environ 25 ont été synthétisées en tant qu'analogues marqués aux isotopes stables, mais seulement 11 sont disponibles dans le commerce. La conséquence est que le composé d'intérêt doit souvent être synthétisé. Un obstacle important qui empêche des analystes de synthétiser les mycotoxines marquées est le prix des isotopes stables. Mais puisque seulement 1 à 10 µg de standard interne enrichi est nécessaire pour des analyses, la faible quantité compense le prix a priori rédhibitoire.

Comme mentionné ci-dessus, le principe de base de l'utilisation d'un standard interne enrichi est d'accéder à la concentration de l'analyte grâce à la mesure du rapport entre le standard et l'analyte. Le standard doit pour cela, être stable pendant des étapes analytiques successives. Chimiquement il est très difficile de faire un marquage uniforme complet et efficace (la multiplication des étapes de synthèse rend le rendement final trop faible et donc la synthèse trop coûteuse). En revanche un marquage ponctuel est plus simple mais il a souvent lieu sur des fonctions réactives et accessibles du composé, ce qui peut rendre le standard interne « vulnérable ». En effet, des réactions avec la partie marquée pourront avoir lieu dans la matrice biologique elle-même ou lors des post-traitements de l'échantillon avant analyse.

Puisque les liaisons carbone-carbone et carbone-azote sont très peu susceptibles d'être cassées, des enrichissements en ^{13}C ou en ^{15}N sont considérées comme très stables. En revanche, les pertes d' ^{18}O ou de ^2H peuvent se produire si ces isotopes sont aux positions labiles. Par exemple, l' ^{18}O dans un groupe carboxylique peut être échangé dans des solutions acides ou basiques, tout comme l' ^2H peut être impliqué dans des liaisons hydrogène. Ceci a été montré par (Boni *et al.*, 1994), qui ont observé la perte de l'isotope ^{18}O sur du tryptophane en solution aqueuse. D'autre part, le deutérium est susceptible d'être impliqué dans des échanges proton-deutérium s'il est activé par les groupes carbonyles adjacents ou des systèmes aromatiques. En conséquence, les mycotoxines ayant seulement comme atomes labiles des atomes d'hydrogène, tels que la patuline, ne sont pas appropriées pour une quantification par un standard interne deutéré. L'utilisation du groupe (TMS) triméthyl silyl, comme l'a démontré Price (Price, 1979), qui a ajouté du $[\text{}^2\text{H}_9]$ - TMS-patuline comme

standard interne pour doser la patuline d'un extrait de jus de pomme, n'est pas non plus satisfaisante. En effet, pendant le procédé de dérivation, les groupes [²H9] - TMS du standard interne et [¹H9] - TMS de la patuline silylée s'échangent, rendant par conséquent, la quantification exacte impossible.

Une autre difficulté provient de petites différences dans les propriétés physiques ou chimiques des isotopologues, généralement appelées effets isotopiques. Les effets isotopiques apparaissent en raison de différentes teneurs en énergie provoquées par les différences de masse des isotopes. Les effets isotopiques sont principalement observables pour l'hydrogène, car la différence de masse entre ¹H et ²H est proportionnellement beaucoup plus importante que celle entre ¹³C et ¹²C ou ¹⁵N et ¹⁴N. L'effet isotopique bien connu et se produisant fréquemment est celui qui affecte le temps de rétention chromatographique. Afin de limiter la séparation chromatographique des isotopologues pendant des étapes de purification sur colonne qui entraînerait une modification du rapport standard interne/analyte, les effets isotopiques doivent être réduits au minimum en choisissant d'enrichir avec du ¹³C ou du ¹⁵N ou en introduisant seulement le nombre minimal de ²H (permettant la séparation des signaux de masse du composé naturel et du le SI).

Si la quantification est réalisée par spectrométrie de masse, le standard interne doit être distinguable de l'analyte, sans équivoque. Ceci exige la présence des signaux de l'ion moléculaire ou des fragments montrant la différence de masse caractéristique du standard interne. Un autre problème dans la différenciation des isotopologues provient du chevauchement spectral entre le standard et l'analyte. Dans le cas de l'analyte naturel, l'abondance naturelle d'isotopes stables, en particulier de ¹³C, ¹⁸O, ou ³⁴S, a comme conséquence de former des massifs isotopiques constitués par le pic de la masse nominale m_A , mais également, avec une intensité plus faible, des pics à m_A+1 , m_A+2 , ou même à des masses plus élevées. En particulier, dans le cas de composés contenant un grand nombre d'atomes de carbone, l'intensité des pics $m+1$ et $m+2$ est significative à cause de l'abondance naturelle relativement élevée (1,08%) du ¹³C. Pour éviter le chevauchement des signaux de ces isotopologues, la différence de masse doit donc être suffisante. Pour les mycotoxines, qui ont des nombres de carbone compris habituellement entre 10 et 20, une différence de masse d'au moins trois unités permet une bonne séparation des signaux. Cependant, le nombre d'isotopes, particulièrement de deutérium, ne devrait pas être trop haut, afin de réduire au minimum

l'effet isotopique mentionné précédemment. Il s'agit donc de faire un compromis entre la différence de masse assurant le non chevauchement des spectres et la minimisation de l'effet isotopique (ceci fera l'étude du chapitre II de ce présent document). Si le chevauchement spectral ne peut être évité, des calculs permettent malgré tout d'accéder à une étude quantitative. Cependant, plus le chevauchement est important, plus ces calculs sont complexes et fastidieux.

IV. Spectrométrie de masse : une technique analytique très sensible

La Spectrométrie de Masse est une technique sensible très puissante d'analyse semi-structurale de composés organiques. Elle vient en complément des autres méthodes spectroscopiques (R.M.N., I.R.) lorsque l'on dispose de produit en quantité suffisante pour ces deux techniques, c'est-à-dire de l'ordre du milligramme. Mais il arrive de plus en plus souvent que cette méthode résolve à elle seule certains problèmes de structure de composés organiques en raison de la faible quantité de substance disponible (environ quelques microgrammes). C'est le cas par exemple, des métabolites de certains médicaments. Néanmoins pour la détermination d'une structure complète (configuration) seules des techniques classiques d'analyse structurale (RMN ou IR par exemple), sont adaptées.

La spectrométrie de masse permet d'autre part l'analyse qualitative de mélanges complexes à l'aide du couplage avec les techniques de chromatographie gazeuse (GC-MS) ou liquide (LC-MS). Elle peut également assurer le suivi de substances marquées par des isotopes lourds non radioactifs comme le carbone 13, l'azote 15, l'oxygène 18... Cette dernière application est très utilisée dans le domaine de la pharmacocinétique ou dans celui de l'étude de la croissance des plantes.

IV-1. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est constitué de quatre parties principales : un système d'introduction de l'échantillon à analyser, une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur (Figure I.14). C'est généralement le système dispersif qui diffère d'un appareil à l'autre. La source d'ions est souvent commune à tous les appareils, mais il existe plusieurs modes d'ionisation qui varient en fonction des applications.

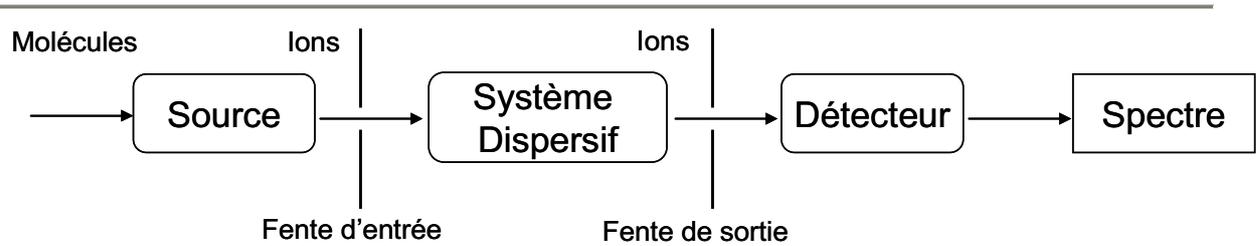


Figure I.14 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse

IV-2. L'ionisation

La source d'ionisation sert à vaporiser les molécules et à les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif par génération d'ions positifs, soit en mode négatif en formant des ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées : l'ionisation électronique ou chimique, l'électrospray ou encore le MALDI pour « désorption-ionisation laser assistée par matrice » en anglais.

Le principe de spectroscopie de masse avec électrospray et trappe ionique (source ionique et analyseur utilisés au laboratoire) est le suivant :

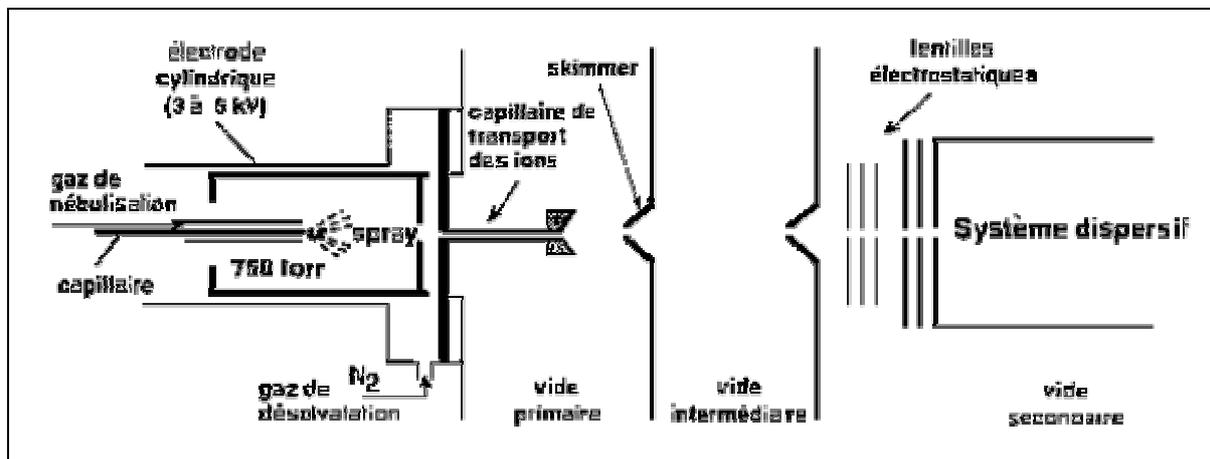


Figure I.15 : Schéma de principe d'une source électrospray

L'ionisation des molécules se déroule à pression atmosphérique et température ambiante, c'est donc la plus douce de toutes les méthodes. Le composé est généralement dissout dans une solution aqueuse (mélange méthanol-eau ou acétonitrile-eau). La solution est introduite dans

la source par l'intermédiaire d'un capillaire d'environ 50 μm de diamètre. Sous l'action d'un gaz nébuliseur (N_2) et celle conjuguée d'un champ électrique, un fin brouillard de gouttelettes polychargées est créé (Figure I.16). En effet, un champ électrique de 3 000 à 5 000 Volts est appliqué entre le capillaire et une contre-électrode et permet l'ionisation de ces gouttelettes. Celles-ci diminuent progressivement de taille par perte de molécules de solvant et la tension superficielle qui maintient la gouttelette en état, devient plus petite que la répulsion électrostatique de type coulombienne, due à la présence des charges. C'est ainsi que la gouttelette éclate en plusieurs gouttelettes filles multichargées et la désolvatation se poursuit. Le processus se répète plusieurs fois et on obtient ainsi une suite de cascades d'explosions coulombiennes (Figure I.16). Le phénomène s'arrête lorsqu'une seule molécule présentant une ou plusieurs charges est formée, car l'énergie correspondant à la répulsion coulombienne ne permet pas de rompre les liaisons covalentes.

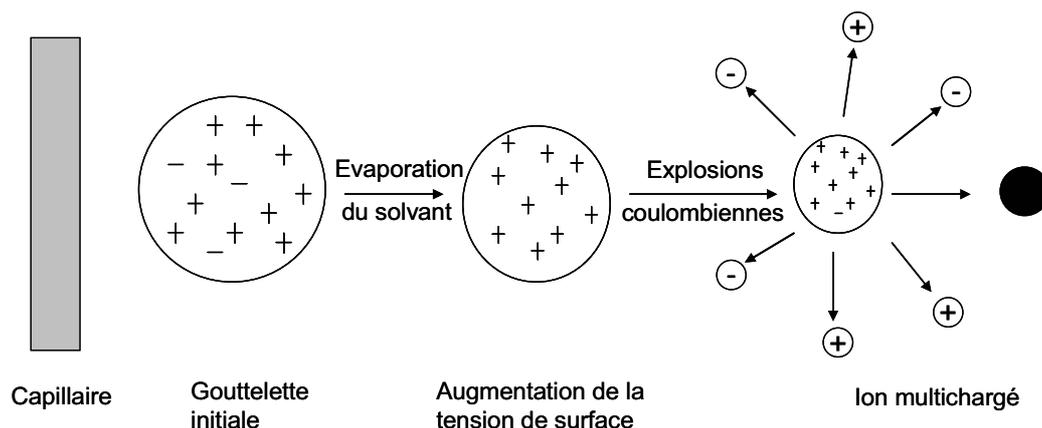


Figure I.16 : Principe de formation d'ions multichargés

Afin d'achever la désolvatation des micro-gouttelettes, on utilise l'azote comme gaz de balayage. On obtient ainsi un ion multichargé en phase gazeuse possédant une très faible énergie interne et qui peut être analysé ensuite dans le système dispersif du spectromètre.

L'avantage de cette méthode est l'obtention d'ions multichargés et multiprotonés qui permettent la détermination de molécules très lourdes, puisque la séparation des ions dans le système dispersif s'effectue suivant le rapport m/z , z pouvant atteindre une centaine de charges. Cette méthode convient parfaitement pour les protéines de haut poids moléculaire.

IV-3. Le système dispersif

Le système dispersif (deux octopoles, dans le spectromètre que nous utilisons) permet de séparer les ions suivant leur rapport m/z avec une résolution variable selon les spectromètres. On obtient alors un spectre composé de pics à différents rapports m/z .

Le guidage des ions vers le détecteur se fait par la suite grâce à un quadripôle. Un quadripôle est constitué de quatre barres à section cylindrique ou hyperbolique comme l'illustre le schéma de la Figure I.17. Les ions sont faiblement accélérés dans la source ionique, de l'ordre de la centaine de volts seulement. On applique sur les barres diamétralement opposées, un champ électrique continu (U) et un champ variable ($V \cos \omega t$).

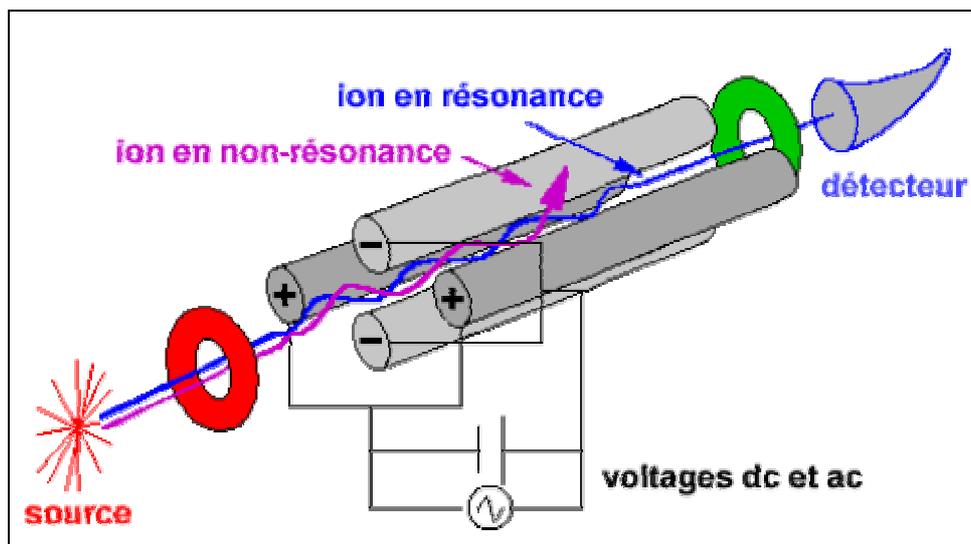


Figure I.17 : Quadripôle

Ce système permet de séparer les ions suivant leur rapport m/z avec une résolution unitaire seulement. Par ailleurs, la sensibilité est faible pour les ions de masse supérieure à 2000 uma¹, ce qui crée une discrimination sur les abondances ioniques sur la gamme de 10 à 4000 uma, valeur maximale de séparation. Il n'est donc pas possible avec un tel système de déterminer les masses exactes des ions.

¹ Unité de Masse Atomique

IV-4. L'analyseur : la trappe d'ion et l'Orbitrap

L'analyseur permet de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z . Il existe des analyseurs basse résolution : le quadripôle, le piège ionique, et des analyseurs haute résolution permettant de mesurer la masse exacte des analytes : le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF), « la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier » (FT-ICR) et l'Orbitrap.

Les analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), Figure I.18. En général, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet de fragmenter les ions et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, constituent plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

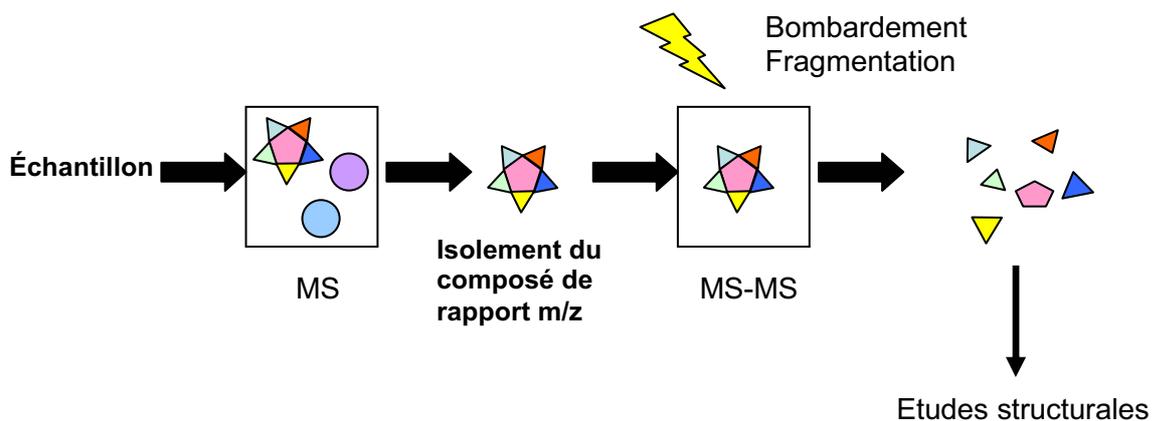


Figure I.18: Principe d'une analyse MS/MS. Schéma simplifié du principe de la spectrométrie de masse utilisée pour des études structurales.

Les étapes de fragmentation peuvent être itératives, c'est-à-dire que les fragments formés peuvent à leur tour être isolés puis fragmentés, etc. On parle alors de multi MS ou MS^n

La trappe ionique, l'analyseur à proprement dit, est constituée d'un ensemble de 3 électrodes; une électrode annulaire centrale (ring electrode), une électrode d'entrée et une électrode de sortie correspondant aux "end cap electrodes". L'électrode annulaire est utilisée pour générer un champ électrique quadripolaire qui permet de piéger les ions et les retenir. Dans les trappes 3D, la capacité de remplissage ne dépasse pas quelques millions d'ions. Si la trappe est remplie par une quantité trop importante d'ions, les ions génèrent eux-mêmes des forces qui

provoquent leur dispersion. Ce phénomène est appelé effet de charge. En pratique, l'effet de charge se traduit par une dégradation importante de la résolution et de la précision de mesure.

Les ions ainsi piégés sont alors éjectés vers le détecteur. Pour cela, la tension de l'électrode annulaire est augmentée progressivement. Les ions sont alors éjectés dans l'ordre de leur rapport m/z croissant. Une moitié des ions est donc éjectée vers l'électrode d'entrée et est perdue, l'autre moitié est éjectée vers l'électrode de sortie et captée par la dynode de conversion qui les convertit en particules secondaires détectées par le multiplicateur d'électrons. Le détecteur, situé après l'électrode de sortie, va transformer les impacts ioniques en signaux électriques.

La trappe d'ions permet également d'isoler et de fragmenter un ion d'un rapport m/z donné dont on souhaite, par exemple déterminer la structure. Avant la fragmentation, l'ion d'intérêt doit être isolé dans la trappe. Tous les autres ions sont donc éjectés de la trappe en appliquant sur les électrodes d'entrée et de sortie des fréquences de résonance des ions à éjecter. Ces électrodes appliquent l'ensemble des fréquences à un voltage important (de l'ordre de 100 V) à l'exception de la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt. Soumis à leur fréquence de résonance, les ions concernés vibrent dans des proportions qui dépassent le volume de la trappe et sont alors perdus. On applique alors la fréquence de résonance de l'ion d'intérêt. L'objectif est de faire résonner l'ion d'intérêt tout en le conservant dans le volume de la trappe. L'ion résonne et percute l'hélium présent dans la trappe avec une énergie suffisante pour induire des fragmentations de l'ion parent. Les fragments n'ont pas la même fréquence de résonance que celle de l'ion parent. Ils n'entrent donc pas en résonance et sont immédiatement focalisés au centre de la trappe. Les fragments sont ensuite analysés suivant le même principe que l'éjection.

Le principe de l'Orbitrap consiste quant à lui, en une électrode centrale (axiale) et une électrode extérieure (circulaire), utilisées pour capturer les ions à la manière d'une trappe à ions. Les électrodes axiales symétriques de l'Orbitrap génèrent un potentiel électrostatique « quadrilogarithmique ». Une trajectoire stable des ions implique alors que ceux-ci aient une trajectoire suivant l'orbite de l'électrode, avec des oscillations harmoniques simultanées dans la direction de l'axe de l'électrode centrale (axe z). La forme spéciale des électrodes permet de produire un potentiel électrostatique exclusivement quadratique dans cet axe z . Ainsi, le mouvement des ions selon cet axe est complètement indépendant du rayon de l'orbitale et de la vitesse angulaire. Le signal correspondant à ces oscillations est ensuite converti en une

fréquence par l'intermédiaire d'une transformée de Fourier. Le pouvoir résolutif de l'Orbitrap peut aller pour les maximum de 100000 (1,9 s d'acquisition) à 60000 (1s), et peut être abaissé à 30000, 15000 et 7500.

IV-5. Le détecteur

Le détecteur transforme les ions en signal électrique. Plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. Enfin, le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être traité informatiquement.

V. Exemples d'applications d'utilisations d'isotopes stables, développées pour des projets de recherche (en dehors du sujet exposé dans le présent manuscrit).

*V-1. Projet AFSSET 2007-063 Environnement-santé-travail « Exposition au risque mycologique par inhalation. Effets sur le tractus pulmonaire de toxines produites par *Aspergillus fumigatus* »*

Ce projet vise à évaluer et à analyser les risques pour la santé humaine de l'inhalation répétée de mycotoxines produites par une espèce contaminante de l'atmosphère intérieure des logements. Une première approche a déjà permis d'isoler par fractionnement un composé perturbant les paramètres électrophysiologiques et de l'identifier comme étant le Verruculogène (Khoufache *et al.*, 2007).

Dans le cadre de ce programme, une approche intégrée est proposée et part de : i) la mise en culture de champignons potentiellement toxigènes ; ii) le fractionnement de ces cultures afin d'identifier les extraits possédant une toxicité ; iii) la caractérisation structurale de ces extraits afin d'identifier les mycotoxines présentes ; iv) l'identification du mode d'action de ces mycotoxines en utilisant des cellules cibles pertinentes : des cellules épithéliales pulmonaires pour aboutir à : v) l'étude de la métabolisation par les cellules pulmonaires des mycotoxines (identification des métabolites obtenus et caractérisation de leur cytotoxicité et de leur mode d'action).

L'approche envisagée afin d'élucider le rôle exact des métabolites pendant l'établissement des pathologies consistera dans un premier temps à faire produire ces métabolites sur des milieux usuels de mycologie, puis sur du papier peint à différentes conditions hygrométriques afin de mimer le plus possible les conditions naturelles. Afin d'obtenir des composés plus aisément identifiables et détectables dans les extraits biologiques animaux, ces mycotoxines enrichies en isotopes stables tels que ^{15}N et le ^{13}C seront produites de façon analogue. L'avantage d'une production de mycotoxines enrichies en isotopes stables résidera dans un meilleur suivi des composés par HPLC/MS, ainsi qu'une meilleure identification structurale par RMN, mais également dans le suivi *in vitro*.

V-2. AFSSET 08-27 : Identification des mycotoxines présentes dans des locaux insalubres.

L'équipe de Stéphane Bretagne (Laboratoire de Parasitologie Mycologie CHU Créteil) avec qui nous collaborons depuis 2 ans dans le cadre de projets AFSSET et ADEME a développé un modèle de tractus pulmonaire utilisant soit des biopsies humaines soit du matériel porcin. Ces modèles d'études permettent de mesurer des variations des paramètres électrophysiologiques lors de contaminations mais aussi à mesurer le transport au travers de l'épithélium pulmonaire et à déterminer des altérations de l'expression des cytokines ou d'enzymes de détoxification (P450 et P-glycoprotéine). Le rapprochement de nos domaines de compétences a permis de démontrer clairement le rôle du verruculogène (*Aspergillus fumigatus*) ou de la sterigmatocystine (*Aspergillus nidulans*) dans l'apparition de dysfonctionnement pulmonaire et potentiellement dans des pathologies de type aspergillose ((Khoufache *et al.*, 2007) en ligne et mémoire de Master 2 d'Odile Cabaret).

Une nouvelle étude a été initiée visant à identifier et doser les champignons et les mycotoxines présentes dans des locaux insalubres. Un premier protocole mis au point consiste à récupérer des morceaux de papiers peints moisissés et leur équivalent non contaminé. Des extraits par solvant organique sont analysés par HPLC-UV et HPLC-MS. L'identification des composés se faisant par :

- leur temps de rétention par rapport à la collection de mycotoxines analysées par Olivier Puel (INRA, Toulouse),
- leur spectre UV et leur spectre de masse disponibles à partir des analyses réalisées à Toulouse et à Saclay ainsi que des valeurs publiées (Cole *et al.*, 2003; Nielsen et Smedsgaard, 2003),

- leur fragmentation par spectrométrie de masse et l'identification structurale déduite des fragments. Les dosages seront effectués en utilisant les authentiques enrichis aux isotopes stables que nous avons produits dans le cadre du projet ANR ou des contrats AFSSET et ADEME. En cas d'ambiguïté d'identification de certains composés, le recours aux cultures des moisissures isolées et identifiées en parallèle sera possible en tentant de reproduire leur production.

Ces études permettront de mieux connaître l'étiologie de certaines pathologies observées chez les populations vivant dans les lieux insalubres. Ce type d'expertise ne semble pas être appliqué en France, seules des études provenant de l'Europe du Nord se retrouvent dans la bibliographie.

V-3. P2 ANR PCV ISOMODTS : Conception de composés stables à visée anti-neurodégénérative basée sur les analogues de l'état de transition défini par mesures isotopiques.

L'instabilité et la dégradation des principes actifs font partie des problèmes majeurs du développement de médicaments et la réponse proposée est souvent l'utilisation de doses plus importantes pour atteindre l'effet souhaité. La prise en compte des facteurs affectant la pharmacocinétique permet dans de nombreux cas de diminuer les doses prescrites, et de ce fait, d'éviter les effets secondaires de type surdosage. Pour de nombreux composés les cytochromes P450 jouent un rôle prépondérant dans ces réactions de désactivation. Afin de limiter ces réactions, le composé peut être soit modifié chimiquement de façon à augmenter sa stabilité, soit administré avec un inhibiteur de l'enzyme responsable de la réaction de dégradation *in vivo*.

L'objectif de ce projet est le développement d'associations médicamenteuses plus efficaces pour le traitement des maladies neurotoxiques et neurodégénératives en ralentissant la dégradation du principe actif. Les molécules servant de base à ce travail sont des dérivés de la nicotine et de la tropine connus pour interagir avec les récepteurs cérébraux et métabolisés par les Cytochromes P450 (isoformes 2A6, 2B6 et 3A4 essentiellement). Le projet est axé sur le « design moléculaire » et la synthèse d'analogues structuraux des états de transition de mécanismes réactionnels des enzymes qui dégradent les composés thérapeutiques cibles. Il permet ainsi de préparer des analogues structuraux comportant des fonctions inhibitrices des enzymes du métabolisme, améliorant ainsi la stabilité des composés thérapeutiques. Ceci nécessite d'appréhender en détail les mécanismes réactionnels de dégradation, la synthèse, l'expérimentation biochimique et la chimie théorique pour l'analyse et l'interprétation du

métabolisme sur modèles humains *in vivo* et *in vitro*. Ce projet regroupe l'équipe de R. Robins CEISAM, UMR6230 à Nantes et l'équipe de Marcel Delaforge du CEA de Saclay. Les états de transition seront définis par l'approche confirmée de la détermination des effets isotopiques cinétiques *in vivo* et leur exploitation pour interpréter le mécanisme réactionnel par chimie *in silico*. Ceci requiert la synthèse des composés cibles isotopiquement enrichis, de manière spécifique. La mesure précise des effets isotopiques cinétiques au cours de la dégradation doit être acquise, ainsi que la modélisation moléculaire de la réactivité des états de transition et le paramétrage des géométries des ligands-récepteurs. Enfin, ce projet demande le développement de voies de synthèse de nouveaux composés stables, basés sur les états de transition ainsi définis. Ce projet fournira une description en profondeur des mécanismes moléculaires des réactions qui engendrent la dégradation des drogues importantes dans la lutte contre la dépendance au tabac et son corollaire le sevrage, ou des effets sur le système nerveux central et leurs implications dans les maladies neurodégénératives. La connaissance ainsi obtenue permettra la conception-modélisation et synthèse de nouveaux composés thérapeutiques prometteurs pour protéger les composés actifs contre leur élimination. Le projet fournira des connaissances préliminaires métaboliques et toxicologiques des nouveaux composés. L'importance des données biochimiques mises à disposition des tests biochimiques sera renforcée, permettant une meilleure efficacité des traitements thérapeutiques.

CHAPITRE II

CALCULS THEORIQUES D'UN SPECTRE DE MASSE DE COMPOSES CONTENANT DES TENEURS VARIABLES EN ISOTOPES STABLES

L'utilisation de composés enrichis par différents isotopes stables (^{13}C , ^{18}O , ^{15}N , ^2D etc.) pour des études quantitatives ou semi-structurales (en dehors de la résolution de la stéréochimie) est tout à fait intéressante en spectrométrie de masse. En effet, alors que le spectre de masse du composé naturel n'est constitué que de deux, voire trois pics de masse provenant de la présence des isotopes naturels les plus abondants, l'enrichissement uniforme par des noyaux stables permet de le remplacer par un massif isotopique composé de cinq jusqu'à plus d'une dizaine de pics, véritable signature du composé enrichi. Ceci constitue un avantage remarquable pour distinguer facilement le produit d'intérêt dans un mélange constitué d'un grand nombre de composés inconnus.

L'objet de ce chapitre est la construction par calculs et l'exploitation théorique d'un spectre de masse d'un composé enrichi en ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N et ^2H .

Après un bref rappel sur les principes fondamentaux de la spectrométrie de masse, nous aborderons la construction d'un spectre de masse (calculs et algorithmes) d'un composé connu à enrichissements fixés. Avant d'exposer la résolution du problème inverse (c'est-à-dire l'exploitation d'un spectre de masse expérimental pour la détermination des enrichissements en isotopes stables), nous validerons les algorithmes de calculs par l'étude des variations des paramètres introduits. Enfin nous présenterons une série de spectres théoriques et expérimentaux de composés naturels et enrichis à titre d'exemples.

I. Rappels sur la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique. De plus, elle permet de préciser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Cf Chapitre I.

Cette technique analytique est parmi les plus sensibles actuellement utilisées pour l'étude d'échantillons biologiques ou chimiques. En effet, elle permet à la fois l'identification mais aussi l'analyse semi-structurale (en dehors des configurations) de composés inconnus puisque les ions peuvent être fragmentés c'est-à-dire coupés en plus petites entités. Les fragmentations respectant des lois précises de chimie en phase gazeuse, l'étude de ces fragments permet de déterminer une partie de la structure de ces ions (Figure I.18). De plus, grâce à une gamme

linéaire allant de 3 à 7 ordres de grandeur, la spectrométrie de masse offre la possibilité de procéder à une analyse quantitative sur un large domaine.

Jusqu'à présent l'identification pouvait se faire en comparant un spectre de masse avec des banques de spectres caractéristiques de molécules connues. Plus récemment, lors de l'utilisation d'analyseurs haute résolution (TOF, secteur magnétique, FT-ICR, Orbitrap), la spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision la masse exacte mono-isotopique d'un ion et d'en déduire sa formule brute.

Dans la plupart des cas, les composés étudiés sont des composés naturels, *i.e.* ayant un massif isotopique naturel constitué de peu de pics. En effet, chaque atome possède un ou plusieurs isotopes qui sont de masses différentes par définition. Ainsi, la proportion de chaque isotope observé sur un spectre de masse naturel est caractéristique de la présence de certains atomes et de leur nombre dans l'ion analysé (en particulier : Cl, Br, qui présentent des isotopes naturels M et M+2 en quantité notable). D'autres règles structurales, comme la règle de l'azote (la parité de la masse mesurée est fonction de la parité du nombre d'atomes d'azote que possède une molécule) permettent, à partir de l'étude précise de la distribution des pics du spectre d'un composé naturel, de retrouver sa formule brute.

Notre objectif se place dans ce cadre à cette différence près que les composés étudiés sont de formules inconnues et qu'ils sont enrichis en ^{13}C ou ^{15}N , voire en ^2H ou en ^{18}O . Les règles précédentes ne sont donc plus utilisables telles quelles, mais doivent tenir compte d'éventuels enrichissements en ^{13}C , ^{15}N , ^2H et ^{18}O . Il s'agit alors d'extraire l'information d'un massif isotopique pour retrouver à la fois la composition, *i.e.* le nombre d'atomes de chaque type, et les enrichissements correspondants en isotopes stables précédemment cités.

Afin de limiter la complexité, nous nous plaçons dans le cadre spécifique du sujet de notre étude, *i.e.* nous nous limiterons à des composés naturels et plus spécifiquement des composés exogènes produits par des micro-organismes (mycotoxines entre autres). Ceci nous permet tout d'abord de nous limiter à des composés ayant un poids moléculaire borné (< 1000), de ne considérer, dans un premier temps, que des composés de formule brute $\text{C}_n\text{N}_p\text{O}_q\text{H}_r$ et enfin de limiter le nombre d'atomes de chaque type ($n < 30$, $r < 70$, $p < 5$ et $q < 10$).

Afin de pouvoir exploiter un spectre de masse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à la façon de construire le spectre de masse d'une molécule connue (enrichissements, nombre et type d'atomes connus). Pour cela nous avons utilisé le logiciel de programmation statistique R et avons vérifié l'allure des variations de ces spectres en faisant varier les huit paramètres du problème, à savoir les quatre enrichissements et les quatre types d'atomes. Cette étape de vérification a eu pour but de valider notre modèle pour pouvoir ensuite, en s'appuyant sur ce modèle, construire un algorithme capable, à partir de la distribution des pics du spectre de masse d'un composé inconnu, de retrouver sa formule brute connaissant ses enrichissements en ^{13}C , ^{15}N , ^2H et ^{18}O , ou bien de retrouver ses enrichissements en ^{13}C , ^{15}N , ^2H et ^{18}O , connaissant sa formule brute. Ces diverses étapes sont présentées ici.

II. Calculs théoriques du spectre de masse d'un composé de formule brute

$\text{C}_n\text{N}_p\text{O}_q\text{H}_r$

La première étape de notre démarche consiste à prévoir l'allure d'un spectre de masse d'une molécule dont la formule brute et l'enrichissement isotopique des différents atomes la constituant, sont donnés. Il s'agit donc de construire le spectre de masse d'un composé connu.

Avant de détailler les étapes de construction d'un spectre de masse et le raisonnement que nous avons utilisé pour cela, rappelons que le système dispersif (deux octopoles, dans le spectromètre que nous utilisons) permet de séparer les ions suivant leur rapport m/z avec une résolution variable selon les spectromètres. On obtient alors un spectre composé de pics à différents rapports m/z . Pour une molécule présentant un enrichissement isotopique de certains de ses atomes, on obtiendra un massif isotopique dépendant du nombre de noyaux enrichis.

II-1. Détails du calcul des probabilités nécessaires à la construction d'un spectre de masse

Pour ce faire, nous avons utilisé plusieurs notations pour les nombres d'atome de C, N, O et H ainsi que pour les enrichissements en leur isotope stable respectif (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O et ^2H).

Tableau II.1 : Notation des nombres d'atomes C, N, O, H et des enrichissements de leurs isotopes stables considérés, ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O et ^2H .

<i>Notations</i>	Nombre d'atomes	Isotope considéré	Enrichissements en isotope
Carbone	n	^{13}C	x
Azote	p	^{15}N	y
Oxygène	q	^{18}O	t
Hydrogène	r	^2H	w

On note M, la masse molaire de la molécule (^{12}C , ^{14}N , ^{16}O , ^1H) : $M = 12 n + 14 p + 16 q + r$

Tableau II.2 : Enrichissements naturels en isotopes stables considérés pour chaque type d'atome.

Atomes	Enrichissements naturels (%)
^{13}C	1,080
^{15}N	0,366
^{18}O	0,200
^{17}O	0,038
^2H	0,015

La prévision d'un spectre de masse d'une molécule connue repose sur des calculs de probabilité : la présence de plusieurs pics aux masses m/z , $m+1/z$, $m+2/z$ est liée au nombre de carbones ^{13}C , d'azote ^{15}N , de deutérium ^2H ou d'oxygène ^{18}O que contient la molécule étudiée. Quant aux différences d'intensité de ces divers pics, elles se justifient par la répartition des différents noyaux enrichis sur l'ensemble des atomes du composé.

Par exemple, pour une molécule uniquement enrichie en ^{13}C , la répartition d'un taux x ($x < 1$) de ^{13}C sur une molécule à n carbones, suit une loi binomiale de paramètres n et x.

Ainsi la probabilité d'avoir k carbones ^{13}C sur les n de la molécule est :

$$P(X=k) = C_n^k \cdot x^k \cdot (1-x)^{(n-k)}$$

Avec $C_n^k = \frac{n!}{k! (n-k)!}$

$m+k/z$: pic décalé de k/z par rapport au composé naturel.

Pour simplifier les notations et dans la mesure où cela ne change en rien les calculs (la distribution de masse n'étant pas modifiée par la charge), nous considérerons désormais que

$z=1$. Ceci est d'ailleurs vrai pour la plupart des composés naturels que nous étudions (mycotoxines).

Il s'agit de calculer l'intensité d'un pic donné, décalé de k par rapport au pic du composé naturel. k est donc fixé, avec $k \in [0 ; n + p + 2q + r]$

D'après les différents enrichissements envisagés, il peut y avoir :

- i ^{15}N , $i \in [0 ; p]$
- j ^{18}O , $j \in [0 ; q]$
- l ^2H , $l \in [0 ; r]$
- $k - i - l - 2j$ ^{13}C avec $i + l + 2j + n > k > i + l + 2j$

A k , i , l et j fixés, on a :

$$P(k - i - l - 2j, i, j, l) = P_1(k - i - l - 2j) \times P_2(i) \times P_3(j) \times P_4(l)$$

Avec :

- $P_1(k - i - l - 2j) = C_n^{k-i-l-2j} x^{k-i-l-2j} (1-x)^{n-k+i+2j+1}$: probabilité d'avoir $k - i - l - 2j$ ^{13}C sur les n carbones de la molécule ;
- $P_2(i) = C_p^i y^i (1-y)^{p-i}$: probabilité d'avoir i ^{15}N sur les p azotes de la molécule ;
- $P_3(j) = C_q^j t^j (1-t)^{q-j}$: probabilité d'avoir j ^{18}O sur les q oxygènes de la molécule ;
- $P_4(l) = C_r^l w^l (1-w)^{r-l}$: probabilité d'avoir l ^2H sur les r hydrogènes de la molécule.

$$P_k = \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q \sum_{l=0}^r P_1(k - i - l - 2j) \times P_2(i) \times P_3(j) \times P_4(l) \quad \text{(formule 1)}$$

Avant de systématiser le calcul informatiquement, une première série de calculs a permis de construire par calculs les spectres de quelques molécules contenant un nombre variable de carbones, en considérant plusieurs enrichissements en ^{13}C (Tableau II.3).

Tableau II.3 : Intensités spectrales de plusieurs composés contenant un nombre variable de carbones pour différents enrichissements ^{13}C .

		Abondance naturelle (1.08%)	Enrichissement 10%	Enrichissement 50%	Enrichissement 99%
CO_2	M (44)	0.99	0.90	0.50	0.01
	M+1 (45)	0.01	0.10	0.50	0.99
$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ (éthanol)	M (46)	0.98	0.81	0.25	0.0001
	M+1 (47)	0.02	0.18	0.50	0.0198
	M+2 (48)	0.001	0.01	0.25	0.98
....					
$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_5^-$ (zéaralénone)	M (317)	0.822	0.150	3.8 10^{-6}	1 10^{-36}
	M+1 (318)	0.162	0.300	$6.9 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-33}$
	M+2 (319)	0.015	0.283	$5.8 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-30}$
	.				
	M+9 (326)	$8 \cdot 10^{-14}$	$1.8 \cdot 10^{-5}$	0.185	$4.4 \cdot 10^{-14}$
	M+17 (334)	$6.6 \cdot 10^{-33}$	$1.6 \cdot 10^{-16}$	$6.9 \cdot 10^{-5}$	0.152
M+18 (335)	$4 \cdot 10^{-36}$	$1 \cdot 10^{-18}$	$3.8 \cdot 10^{-6}$	0.834	

Il s'agit ici des probabilités calculées pour des molécules contenant 1, 2 et 18 atomes de carbone avec des enrichissements naturel (1,08%), 10%, 50% et 99% de ^{13}C . Toutes les intensités ont été déterminées à partir de la formule 1 énoncée ci-dessus.

Cette approche constructive nous a permis de valider notre raisonnement pour une variation unique du nombre de carbones (n) et de l'enrichissement correspondant en ^{13}C (x).

II-2. Exemples de la construction du spectre de masse de la zéaralénone ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$).

II-2.1. En ne considérant que l'enrichissement en ^{13}C

Ici le paramètre de la loi binomiale est $n=18$

Afin de pouvoir directement comparer nos résultats aux données expérimentales, on se place dans le cas d'une analyse en mode négatif, c'est-à-dire qu'en l'absence d'enrichissement, le pic majoritaire sera à M-1 (arrachement d'un proton) :

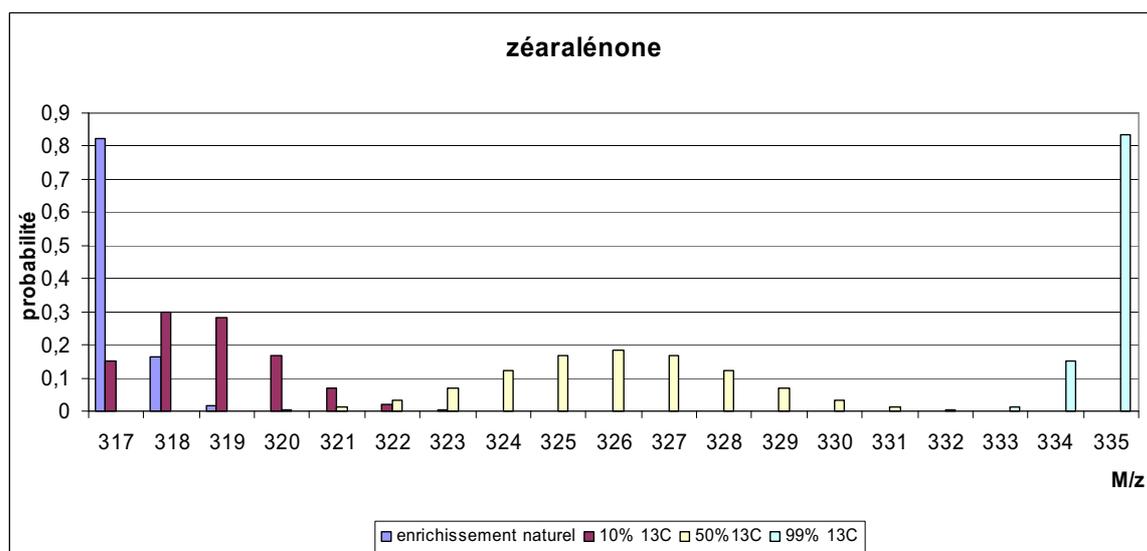


Figure II.1 : Spectres de masse théoriques de la ZEN à différents enrichissements (probabilités). Les spectres ont été représentés en mode négatif (M-H). Bleu : enrichissement naturel ; rouge : 10% ^{13}C ; jaune : 50% ^{13}C ; azur : 100% ^{13}C .

Il est important de noter que le massif isotopique est d'autant plus facilement repérable sur un spectre de masse qu'il est étalé et caractérisé par une allure gaussienne. Ainsi l'enrichissement à 99% est intéressant d'un point de vue quantitatif (la signature en masse est symétrique, avec un décalage de n carbones, par rapport au composé totalement ^{12}C), mais semble moins intéressant pour l'exploitation de spectres de masse qu'un enrichissement à 50% (dont le massif s'étale sur un intervalle d'une amplitude d'environ de dix m/z). Notons néanmoins que si le massif est avantageux pour son amplitude en masse, il présente un inconvénient en intensité : l'intensité maximale du massif s'amointrit à mesure que l'amplitude du massif augmente (l'aire totale des massifs est constante quel que soit l'enrichissement).

On constate également que l'enrichissement d'un composé comme la zéaralénone, permet d'obtenir au niveau du spectre de masse, un massif isotopique caractéristique du composé et facilement identifiable, quelles que soient les concentrations utilisées.

Ce massif peut être très utile dans l'identification et la reconnaissance de métabolites de molécules : les métabolites formés présenteront le même massif isotopique que la molécule mère.

Par ailleurs, il est intéressant de remarquer qu'avec un enrichissement de 50% de ^{13}C , le pic majoritaire est à m/z 326, soit à un rapport m/z décalé de $326-317 = 9$, ce qui représente une pondération de $9/317 \sim 3\%$ de masse. En revanche, avec un enrichissement de 99%, on a une différence de masse de $335-317 = 18$, soit près de 6%. Or si l'on veut conserver au mieux les

caractéristiques physico-chimiques de la zéaralénone, la différence pondérale introduite par l'enrichissement isotopique doit être minimisée au maximum.

Ce marquage présente aussi un intérêt considérable pour l'utilisation de standards internes qui permettraient de doser des composés tels que des xénobiotiques que l'on trouve en petites concentrations dans l'organisme et dont les rendements d'extraction et de purification sont très variables (dépendant du support : plasma, urines, fèces, etc.). Ainsi, après un étalonnage à l'aide de plusieurs solutions contenant un mélange de zéaralénone ^{12}C à différentes concentrations avec une quantité connue de zéaralénone ^{13}C (on trace par exemple le rapport des intensités de deux pics de chaque mélange : 317/pic max avec enrichissement au ^{13}C , en fonction de la concentration en zéaralénone ^{12}C), il est possible de remonter à sa concentration initiale. Il suffit pour cela de mélanger le composé à une quantité connue de son homologue marqué au ^{13}C puis de procéder aux étapes de purification/extraction nécessaires et grâce à la courbe d'étalonnage, de quantifier le composé d'intérêt (Cf Chapitre I).

II-2.2. Contribution de l' ^{18}O au spectre de masse de la ZEN

Dans le cas de la zéaralénone avec un enrichissement isotopique de 10% de ^{13}C , la contribution de l' ^{18}O , d'abondance naturelle, est assez limitée, comme cela apparaît sur le diagramme de la Figure II.2.

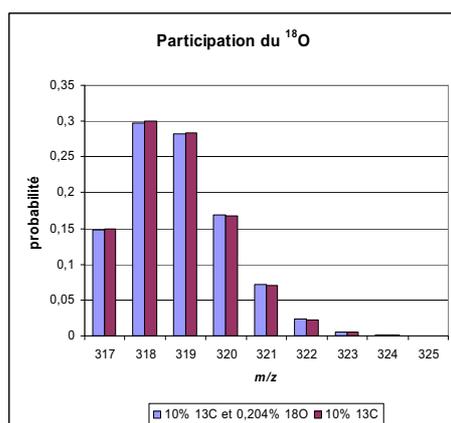


Figure II.2 : Massifs isotopiques de la zéaralénone enrichie à 10% de ^{13}C en tenant ou non compte de l'abondance naturelle de l' ^{18}O .

Le spectre violet correspond au spectre de la ZEN enrichie avec 10% de ^{13}C , sans tenir compte de l'abondance naturelle en ^{18}O . Le spectre bleu tient compte des deux enrichissements (10% ^{13}C , 0,204% ^{18}O).

II-3. Détermination de l'enrichissement optimal en ^{13}C .

À ce stade, il est également intéressant de calculer l'enrichissement minimal en ^{13}C , *i.e.* le moins coûteux, qui permet d'obtenir une intensité relative pour le pic du composé entièrement ^{12}C inférieur à 1/10 000 par rapport au pic majoritaire. Ce rapport découle des normes de la FDA¹ pour pouvoir utiliser la molécule enrichie comme standard interne sans interférence notable entre le standard ^{13}C et l'analyte ^{12}C . En effet, le standard interne est ajouté à une solution contenant la molécule à doser comme précédemment évoqué. Le principe de la quantification repose sur le rapport du pic majoritaire du standard interne ^{13}C (à m/z 326 pour la zéaralénone dans le cas d'un enrichissement à 50%) par le pic majoritaire du composé entièrement ^{12}C (à m/z 317 pour la zéaralénone).

II-3.1. Exemple sur la zéaralénone

Ainsi le signal du pic à m/z 317 du standard interne ne doit pas modifier celui du composé, c'est-à-dire qu'il ne doit pas contribuer au pic majoritaire du composé entièrement ^{12}C à plus de 1 pour 10 000, valeur que nous avons retenue pour avoir un rapport de quantification utile de quatre log entre le standard interne et le composé à doser.

¹ Food and Drug Administration, pour laquelle il faut fournir la preuve de la limite de détection. Or en présence d'un standard interne enrichi à 10% de ^{13}C , le signal MS de la masse nominale ne peut pas être nul.

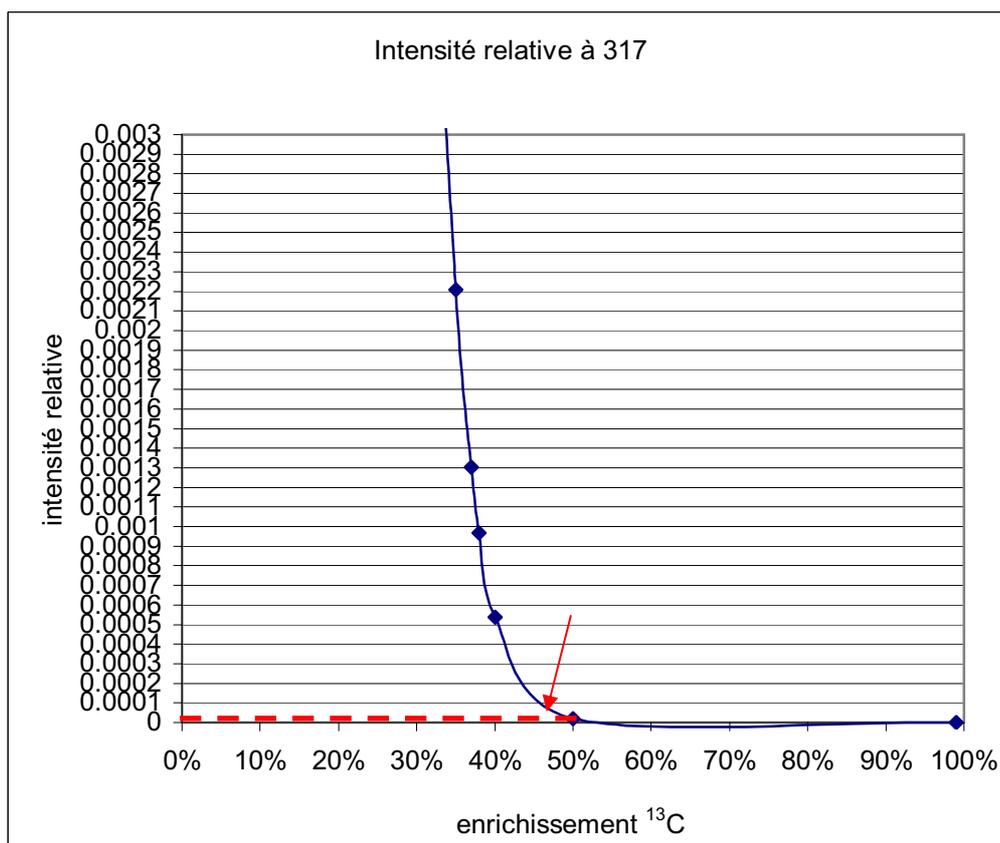


Figure II.3 : Intensité relative du pic majoritaire de la zéaralénone enrichie par rapport au pic à m/z 317 (pic majoritaire du composé totalement ¹²C).

L'intensité relative est le rapport de l'intensité du pic majoritaire du massif spectral de la ZEN par l'intensité du pic nominal (à m/z 317) pour des enrichissements de ¹³C compris entre 0 et 1.

On constate que l'enrichissement optimal pour la ZEN se situe autour de **46%**, avec une intensité relative à m/z 317 de $8,24 \cdot 10^{-5}$.

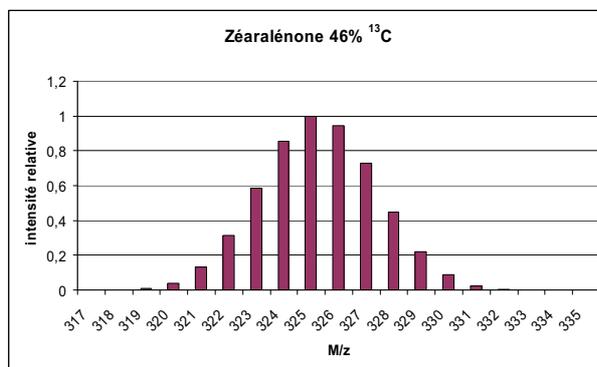


Figure II.4 : Massif isotopique calculé de la zéaralénone enrichie à 46% de ¹³C (enrichissement minimal pour obtenir un pic du composé totalement ¹²C ayant une intensité inférieure à 1/10 000).

Le rapport optimal de 46% de ¹³C a été obtenu à partir du graphe de la Figure II.3.

Un massif isotopique caractérise alors l'enrichissement au ^{13}C , avec une intensité relative de zéaralénone ^{12}C (pic de masse nominale m/z 317) de 0,000082 par rapport au pic à m/z 325.

Bien entendu cet enrichissement minimal dépend du nombre de carbones d'une molécule, variant ainsi d'un composé à l'autre.

II-3.2. Cas général d'une molécule contenant n carbones

D'une manière plus générale, si nous nous intéressons à d'autres composés naturels (autres mycotoxines) ayant n carbones, nous pouvons calculer les intensités relatives du pic de masse nominale M (pic du composé uniquement ^{12}C , appelé pic nominal) par rapport au pic majoritaire du composé enrichi en fonction des taux d'enrichissement au ^{13}C .

Nous avons choisi ici de nous limiter à $n=20$ dans la mesure où la majorité des composés auxquels nous nous intéressons (les mycotoxines ou les composés ayant un intérêt thérapeutique, *e.g.* l'acide mycophénolique de formule $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6$) ont un nombre de carbones ne dépassant pas 20.

Il est alors intéressant de pouvoir prévoir quel taux d'enrichissement minimal est nécessaire pour obtenir une intensité relative du pic M du composé totalement ^{12}C par rapport au pic majoritaire enrichi inférieure à 1/10 000. En traçant un graphe en 3D avec le nombre de carbones, en fonction de l'intensité relative et du taux d'enrichissement, nous pouvons construire des abaques qui permettent une telle prévision (Figure II.5 et Figure II.6).

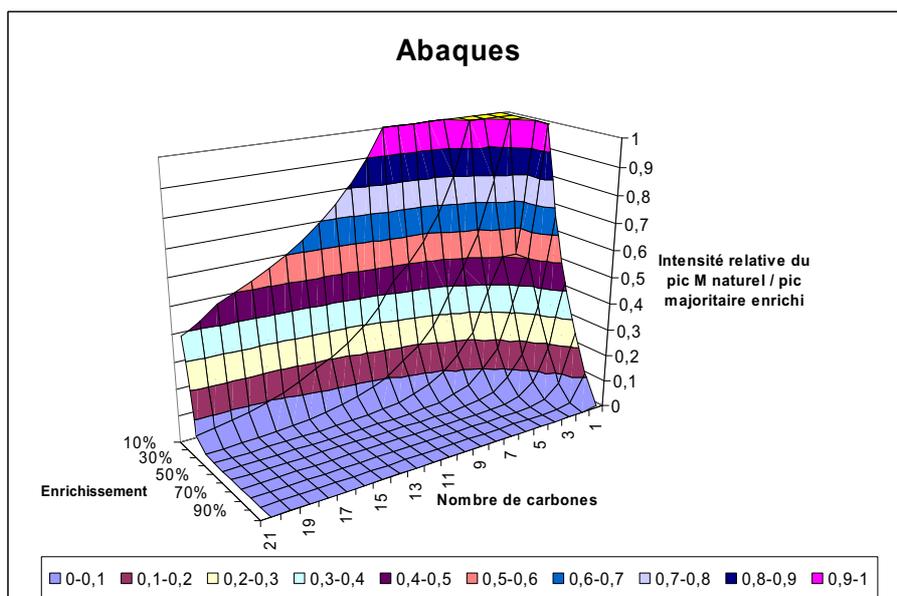


Figure II.5 : Représentation 3D de l'intensité relative du pic majoritaire du composé totalement ^{12}C (M) par rapport au pic majoritaire du composé enrichi en fonction du nombre de carbones et de l'enrichissement.

En zoomant sur les intensités relatives sur les valeurs inférieures à 10^{-3} , on obtient le graphe en 3D suivant :

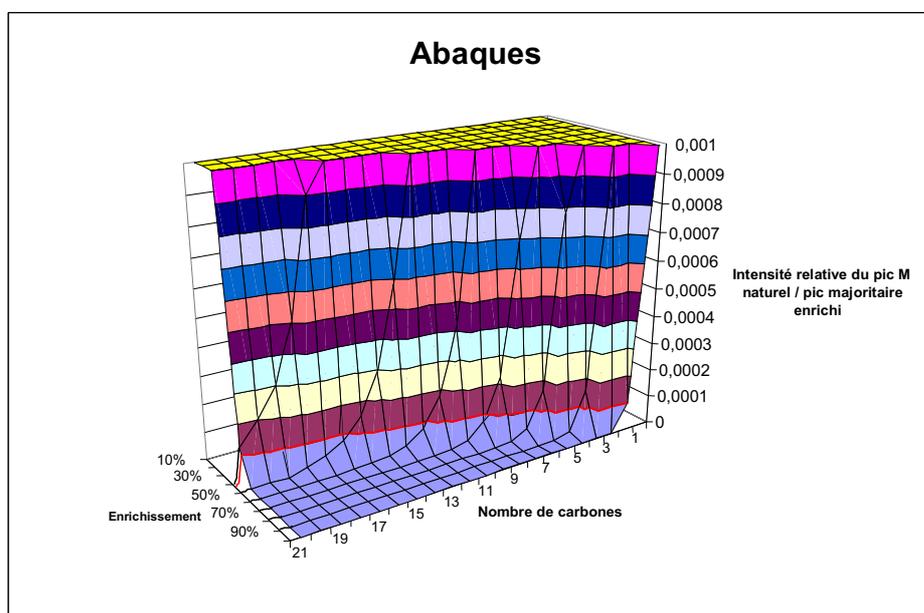


Figure II.6 : Zoom en représentation 3D de l'intensité relative du pic majoritaire du composé totalement ^{12}C (M) par rapport au pic majoritaire du composé enrichi en fonction du nombre de carbones et de l'enrichissement entre 0 et 10^{-3} .

La ligne rouge représente la valeur 10^{-4} , valeur que nous avons retenue pour avoir un rapport de quantification de quatre log entre les intensités du pic nominal du standard interne et du composé à doser.

Ainsi, dans le cas de la patuline (7 carbones), le taux d'enrichissement minimal est autour de 75% pour avoir une intensité relative du pic M inférieure à 1 / 10 000. Ici encore, nous pouvons constater que des composés ayant un nombre de carbones n inférieur à 10 devront être très fortement enrichis pour être utilisés comme standards internes. C'est pourquoi, cette démarche ne paraît pas tout à fait adaptée au dosage de tels composés comme c'est le cas pour l'acétate ou le glucose.

III. Formulation et mise en équations du problème de prévision avec plusieurs isotopes d'un point de vue algorithmique

Dans le souci de généraliser et d'automatiser ces derniers calculs qui n'ont pris en compte, rappelons-le, que l'enrichissement en ^{13}C , le calcul du spectre de masse théorique d'une molécule organique de formule $\text{C}_n\text{N}_p\text{O}_q\text{H}_r$ ¹ a été réalisé à l'aide du logiciel R². En effet, comme cela a pu paraître dans les paragraphes précédents, les calculs peuvent être assez fastidieux, rendant impossible la construction manuelle d'un spectre de masse quand plusieurs types d'atome et plusieurs enrichissements sont considérés.

Détails de la construction de l'algorithme de calcul à paramètres fixés en R :

- Calcul de $P_1(k - i - l - 2j) = C_n^{k-i-2j-l} x^{k-i-2j-l} (1-x)^{n-k+i+2j+l}$;
- Calcul de $P_2(i) = C_p^i y^i (1-y)^{p-i}$;
- Calcul de $P_3(j) = C_q^j t^j (1-t)^{q-j}$;
- Calcul de $P_4(l) = C_r^l w^l (1-w)^{r-l}$
- Calcul de $P_{ijkl}(k) = P_1 * P_2 * P_3 * P_4(k)$, à i, j et l fixés ;
- Somme sur i, j et l des $P_{ijkl} = \text{veck}(k)$, à k fixé ;
- Construction du vecteur $\text{Pk}(k) = \text{veck}(k)$;
- Graphe de Pk en fonction de k, et création d'un fichier texte contenant les probabilités et la liste des masses correspondantes.

Pour la ZEN, de formule brute $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$, différents enrichissements en ^{13}C ont été testés et comparés aux spectres expérimentaux dont nous disposons (Figure II.7).

¹ Nous nous sommes limités uniquement à des molécules organiques 'simples', *i.e.* constituées des seuls atomes CNOH. Nous ne nous intéressons pas aux molécules soufrées, phosphorées ou autre dans cette première étude.

² R est un langage informatique adapté à l'environnement statistique et graphique qui a été développé dans les laboratoires de Bell (précédemment AT&T et maintenant Lucent Technologies) par l'équipe de John Chambers.

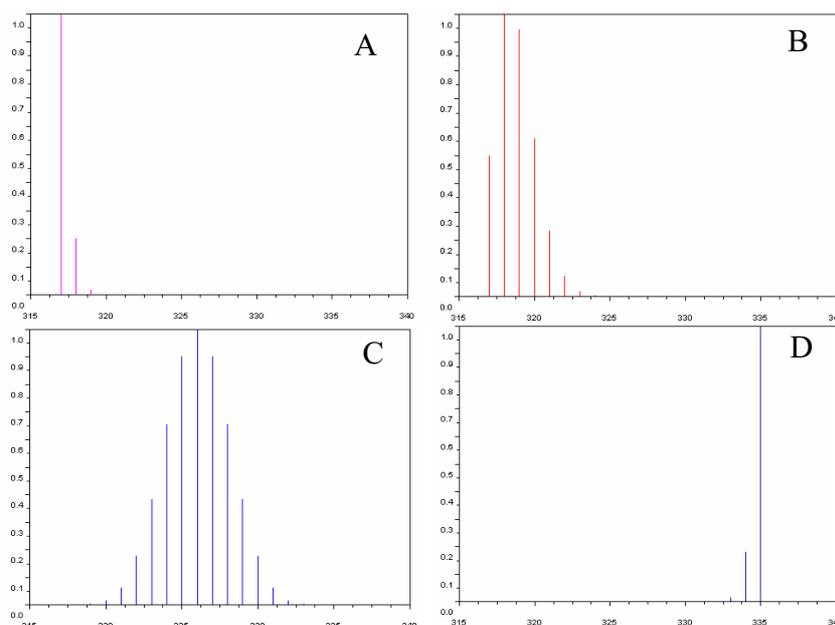


Figure II.7 : Spectres de masse simulés de ZEN enrichie à différents taux de ^{13}C . (A : 1,08% de ^{13}C ; B : 10% de ^{13}C ; C : 50% de ^{13}C ; D : 99% de ^{13}C).

Ce programme nous fournit, pour des paramètres d'entrée donnés, en plus des spectres de masse, les intensités (correspondant aux probabilités) des pics du spectre généré ainsi que la moyenne et l'écart type de la distribution obtenue. En effet, cette distribution étant issue d'une loi binomiale, le spectre prend l'allure d'une Gaussienne pour des enrichissements croissants, d'où l'intérêt de caractériser cette distribution plus simplement par sa moyenne (*i.e.* l'écart entre le pic nominal de la molécule et le pic majoritaire obtenu) et son écart type. On réduit ainsi le nombre de données caractéristiques d'un spectre : initialement un spectre de masse était caractérisé par l'intensité de ses pics, *i.e.* une dizaine d'intensités voire plus, alors que nous réduisons sa caractérisation à deux nombres (moyenne et écart type).

IV. Études des variations des différents paramètres considérés

Dans le but de vérifier la fiabilité des résultats fournis par le programme (intensités et distribution), nous avons vérifié la distribution des probabilités obtenues en faisant varier les enrichissements de chaque isotope ($x, y, t, w \in [0 ; 1]^4$) et en faisant varier les nombres de chaque type d'atome ($n \times p \times q \times r \in [0 ; 20] \times [0 ; 10] \times [0 ; 10] \times [0 ; 50]$).

Les distributions de probabilités obtenues ayant toutes une forme proche d'une Gaussienne, nous avons choisi, comme expliqué précédemment, de représenter les variations de la moyenne et de l'écart type des distributions de probabilités obtenues.

IV-1. Variation de chaque paramètre séparément

Pour commencer, nous n'avons pas fait varier tous les paramètres ensemble, mais un par un en maintenant les autres constants, puis quatre par quatre (nombres d'atomes variables avec enrichissements constants ou enrichissements variables avec nombres d'atomes constants). Pour les variations de nombre d'atomes (n, p, q et r), nous avons choisi de fixer les enrichissements x, y, t et w à des valeurs moyennes (entre 0,2 et 0,7) ; pour les variations des enrichissements nous avons fixé les nombres d'atomes à une valeur intermédiaire sur leur intervalle de variation : 11 pour n (qui est compris entre 0 et 20), 5 pour l'azote et l'oxygène (qui sont compris entre 0 et 10), et enfin 23 pour l'hydrogène (qui est compris entre 0 et 50). Ainsi nous avons d'abord fait varier chaque paramètre l'un après l'autre en gardant les autres fixes : le Tableau II.4 précise les valeurs des paramètres fixés (en ligne) quand le 8^e est variable (colonne).

Tableau II.4: Valeurs des paramètres fixés (en ligne) lors de la variation de l'un d'entre eux (en colonne).

	n_{var}	p_{var}	q_{var}	r_{var}	x_{var}	y_{var}	t_{var}	w_{var}
$n_{\text{fixé}}$		18	18	18	11	11	11	11
$p_{\text{fixé}}$	2		5	5	5	5	5	5
$q_{\text{fixé}}$	5	5		5	5	5	5	5
$r_{\text{fixé}}$	22	22	22		23	23	23	23
$x_{\text{fixé}}$	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5	0,5	0,5
$y_{\text{fixé}}$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2
$t_{\text{fixé}}$	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5
$w_{\text{fixé}}$	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	

Par exemple, pour q variable entre 0 et 10, les autres paramètres sont maintenus constants aux valeurs indiquées dans la 4^{ème} colonne du tableau ci dessus ($n_{\text{fixé}} = 18$; $p_{\text{fixé}} = 5$; $r_{\text{fixé}} = 22$; $x_{\text{fixé}} = 0,5$; $y_{\text{fixé}} = 0,2$; $t_{\text{fixé}} = 0,5$ et $w_{\text{fixé}} = 0,5$).

Les graphes présentant les variations de la moyenne et de l'écart type des distributions calculées sont conformes aux attentes :

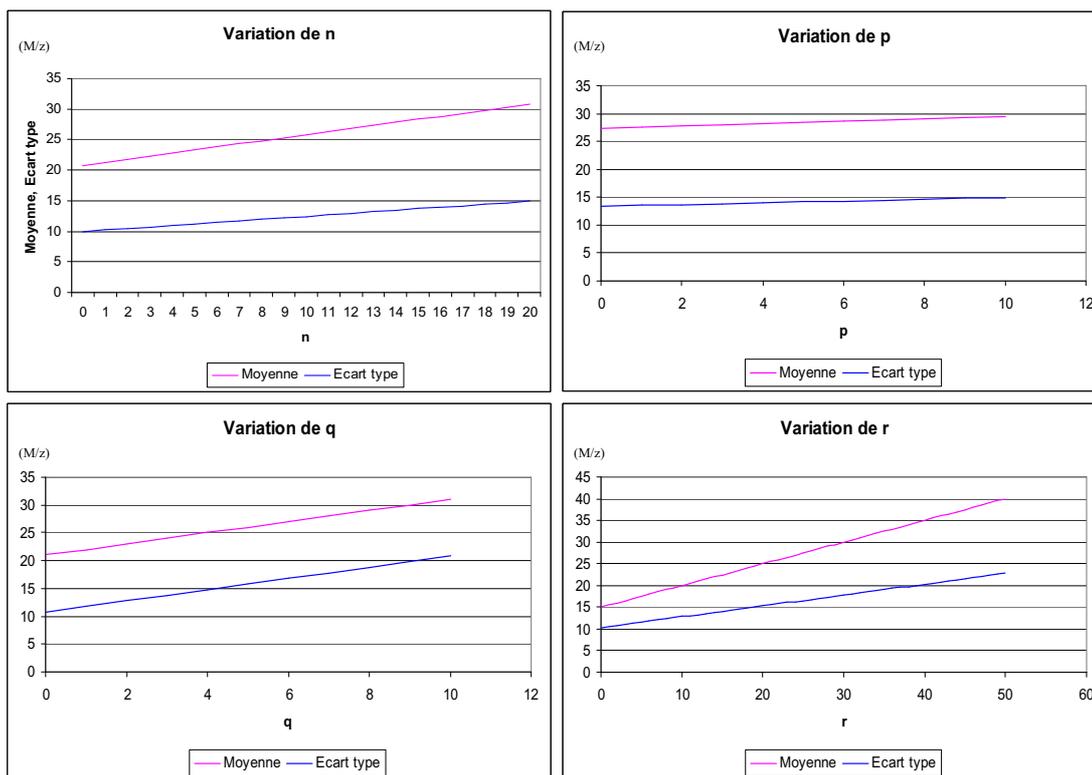
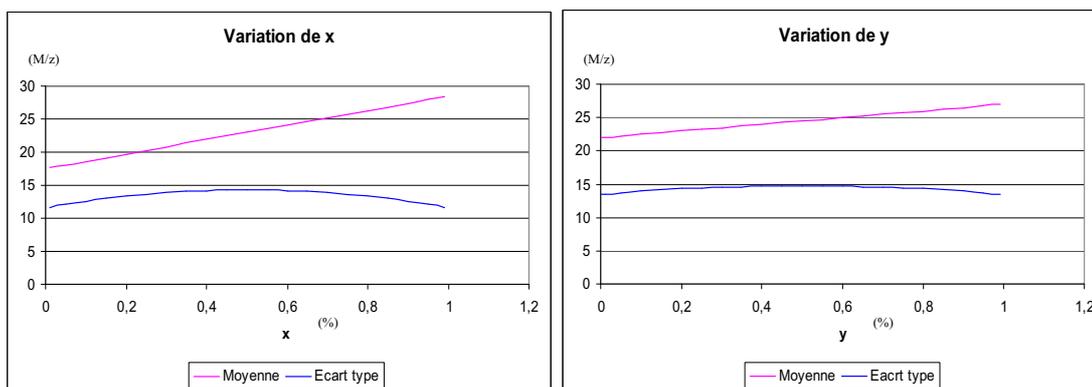


Figure II.8 : Variations de la moyenne (rose) et de l'écart type (bleu) en fonction de différents types d'atomes (n : carbone, p : azote, q : oxygène et r : hydrogène).

Aussi bien la moyenne que l'écart type augmentent linéairement avec les nombres d'atomes de chaque type, à enrichissements constants (Figure II.8). La moyenne étant un rapport m/z , si le nombre d'atomes augmente, la masse augmente et donc la moyenne avec. Quant à l'écart type, qui rend compte de la dispersion de la distribution autour de la moyenne, il augmente du fait de l'apparition de pics nouveaux et de l'étalement du massif isotopique, liés à l'augmentation du nombre d'atomes.

Les variations sont moins importantes pour le nombre d'azote (p) car l'enrichissement a été fixé à 0,2 alors que tous les autres enrichissements ont été fixés à 0,5 ou 0,7 (Figure II.8 en haut à droite).



(M/z)

(M/z)

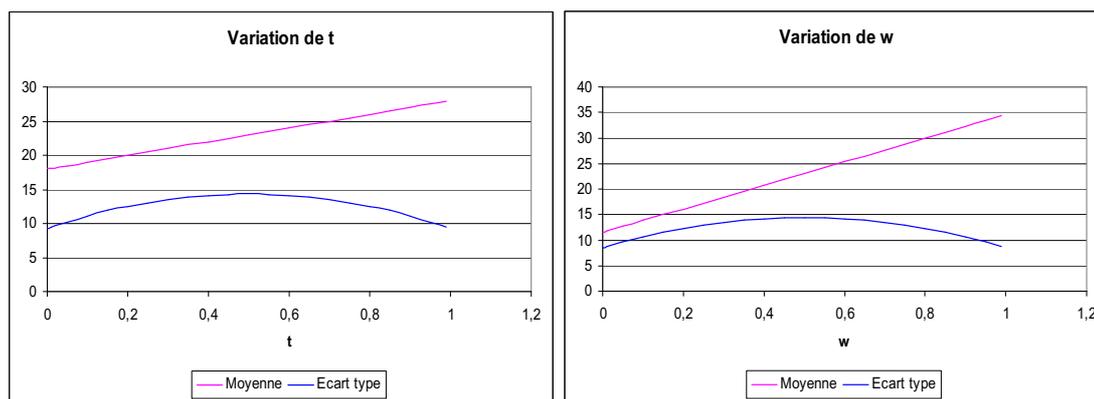


Figure II.9 : Variations de moyenne (rose) et de l'écart type (bleu) en fonction de différents enrichissements en isotopes stables (x : ^{13}C , y : ^{15}N , t : ^{18}O et w : ^2H).

Plus les enrichissements sont importants, plus le décalage de masse sera important entre le pic du composé complètement ^{12}C et le pic majoritaire du composé enrichi, ce qui explique l'augmentation linéaire de la moyenne avec les enrichissements (Figure II.9). En revanche, l'écart type augmente jusqu'à une valeur maximale atteinte pour un enrichissement de 0,5, se traduisant par un étalement maximum du massif isotopique, puis diminue puisque le massif se resserre autour du pic majoritaire qui atteint un maximum pour la valeur $m/z = M_0 + \alpha$, α étant le nombre d'atomes de l'enrichissement correspondant (Figure II.9).

Il semblerait, au regard de ces graphes, qu'une même combinaison (Moyenne, Écart type) corresponde à plusieurs combinaisons atomes/enrichissements, ce qui signifierait que ces deux paramètres seuls ne constituent pas des données spécifiques d'une distribution. Par ailleurs, il convient de rappeler à ce stade que cette étude des variations de la moyenne et de l'écart type en fonction des paramètres « enrichissements » et « nombre d'atomes de chaque type » n'a été faite qu'en vue de valider notre modèle en vérifiant la compatibilité des variations avec nos attentes et non dans le but d'obtenir des calculs prédictifs. En effet rappelons que nous ne cherchons pas à utiliser ces variations directement pour répondre aux objectifs que nous nous étions initialement fixés. La caractérisation complète d'un composé (nombre d'atomes et enrichissements isotopiques correspondants) à partir de son seul spectre de masse expérimental fera l'objet d'une autre étude et nécessitera la construction d'un autre algorithme à part entière. Ainsi, la présence de combinaisons aberrantes en termes d'atomes ne nous gêne pas ici. Néanmoins, afin d'aller plus loin et d'étudier la distribution des probabilités (en réalité celle de la moyenne et de l'écart type d'une distribution pour une combinaison des 8 paramètres fixés) il est plus prudent d'étudier les variations simultanées de tous les paramètres et non de se limiter aux variations indépendantes de chaque paramètre.

IV-2. Variation des nombres d'atomes d'une part et des enrichissements d'autre part

Poussée à l'extrême, l'étude de la distribution des probabilités nécessite donc de faire varier les 8 paramètres simultanément, ce qui fait près de $2 \cdot 10^9$ combinaisons en faisant varier les enrichissements de 0,1 en 0,1 (11 valeurs entre 0 et 1). En réalité, la chimie n'autorise pas n'importe quelle association : le carbone a une valence de 4, l'azote de 3, l'oxygène de 2 et l'hydrogène de 1. Ainsi, par exemple, on ne pourra pas obtenir de molécules constituées d'atomes du même type (molécules homo-atomiques) de seulement 4 atomes d'oxygène ou de 3 atomes d'azote, ni de molécules uniquement constituées d'hydrogène avec plus de deux atomes¹.

Les deux contraintes imposées, sont alors :

- $r = 4n + 3p + 2q - 2K$, avec $K > n + p + q - 1$;
- $\left\{ \begin{array}{l} \text{si } M \text{ est paire, } p \text{ est pair ou nul} \\ \text{si } M \text{ est impaire, } p \text{ est impair.} \end{array} \right.$

C'est pourquoi, le nombre de combinaisons possibles est en réalité plus petit. Néanmoins, même en tenant compte de telles restrictions, si l'on veut faire varier les huit paramètres ensemble le temps de calcul reste trop long et les données générées, trop importantes. A ce stade, une limitation supplémentaire s'est imposée : nous avons choisi de faire varier séparément le nombre d'atomes d'une part et les enrichissements d'autre part. Pour cela, un autre langage de programmation a été utilisé, le langage C++ car les temps de calculs demeuraient encore trop longs pour le calcul sous R. Ainsi toutes les données suivantes ont été calculées à l'aide de ce 2^e programme écrit par Maxime Taron², du laboratoire de Mathématiques Appliquées aux Systèmes de l'École Centrale Paris.

Pour ce faire, de nouvelles notations ont été introduites :

- n_N : nombre d'atomes d'azote ; n_C : nombre d'atomes de carbone ; n_O : nombre d'atomes d'oxygène ; n_H : nombre d'atomes d'hydrogène.

¹ Plus précisément, la formule brute de molécules insaturées (ni cycle, ni liaison multiple) est : $C_a H_{2a+2+c} O_b N_c$, et pour une molécule contenant des liaisons doubles (sans cycle) : $C_a H_{2a+c} O_b N_c$.

² ECP, laboratoire MAS.

- X_N : enrichissement en azote 15 ; X_C : enrichissement en carbone 13 ; X_O : enrichissement en oxygène 18 ; X_H : enrichissement en deutérium.

Pour les calculs, la distribution de masse a été considérée comme la distribution d'une variable aléatoire réelle égale à une combinaison linéaire des variables aléatoires n_O , n_N , n_C et n_H , suivant chacune une loi binomiale : $N = 2*n_O + n_N + n_C + n_H$. Ainsi sa moyenne ($E(N)$) est une combinaison linéaire des moyennes ($E(n_i)$) et sa variance ($V(N)$), une combinaison linéaire des variances ($V(n_i)$):

$$E(N) = 2 * E(n_O) + E(n_N) + E(n_C) + E(n_H)$$

$$E(N) = 2 * n_O * X_O + n_N * X_N + n_C * X_C + n_H * X_H$$

$$V(N) = 2 * V(n_O) + V(n_N) + V(n_C) + V(n_H)$$

$$V(N) = 2 * n_O * X_O * (1 - X_O) + n_N * X_N * (1 - X_N) + n_C * X_C * (1 - X_C) + n_H * X_H * (1 - X_H)$$

Les intervalles de variations de chacun des paramètres sont présentés dans le Tableau II.5.

Tableau II.5 : Choix des paramètres pour les variations d'atomes d'une part et d'enrichissements d'autre part. La deuxième ligne du tableau, en gras, correspond à la variation des nombres d'atomes avec des enrichissements naturels.

Type de variations	n°	n_O	n_N	n_C	n_H	X_O	X_N	X_C	X_H	nombre de combinaisons
Variations des atomes	1	[0:10]	[0:5]	[5:30]	[1:70]	0,002	0,0037	0,0108	0,00015	120120
	2	[0:10]	[0:5]	[5:30]	[1:70]	0,002	0,0037	0,5	0,00015	120120
	3	[0:10]	[0:5]	[5:30]	[1:70]	0,002	0,5	0,0108	0,00015	120120
Variations des enrichissements	4	2	1	10	24	[0:1] avec un pas de 0,1	14641			
	5	5	3	30	58	[0:1] avec un pas de 0,1	14641			

Dans les graphes suivants, les variations de la moyenne et de la variance sont représentées en fonction du nombre de combinaisons. Ces combinaisons correspondent aux variations, dans l'ordre, du nombre d'hydrogènes, du nombre de carbones, du nombre d'azotes, puis du

nombre d'oxygènes. Ainsi la combinaison n°1 correspond, d'après le choix des intervalles de variations présentées dans le Tableau II.5, à $n_O = 0$, $n_N = 0$, $n_C = 5$ et $n_H = 1$ et la combinaison n°2 correspond à $n_O = 0$, $n_N = 0$, $n_C = 5$ et $n_H = 2$, etc. Le nombre total de combinaisons est alors de 120 120. Par ailleurs, les variations obtenues étant périodiques, nous avons extrait et représenté un ou deux motifs de base sur une figure à part (Figure II.11, Figure II.13 et Figure II.15).

Nous avons d'abord fait varier les nombres d'atomes en conservant les enrichissements constants :

- variation n°1 : enrichissements naturels (Figure II.10 et Figure II.11) ;
- variation n°2 : enrichissements naturels pour ^2H , ^{18}O et ^{15}N et 50% ^{13}C (Figure II.12 et Figure II.13) ;
- variations n°3 : enrichissements naturels pour ^2H , ^{18}O et ^{13}C et 50% ^{15}N (Figure II.14 et Figure II.15).

Puis nous avons fait varier les enrichissements en conservant les nombres d'atomes fixes :

- variation n°4 : $\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{NO}_2$ (Figure II.16) ;
- variation n°5 : $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_5$ (Figure II.17).

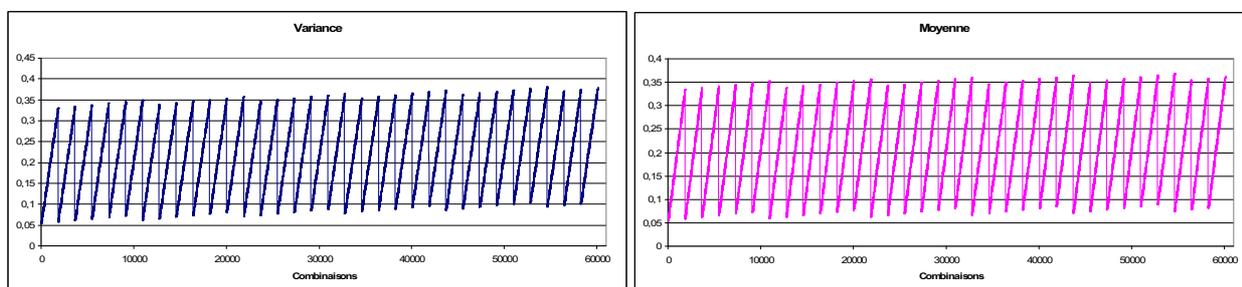


Figure II.10 : Variance (gauche) et moyenne (droite) des distributions de masses pour les 60 000 premières combinaisons d'atomes avec des enrichissements naturels (variation n°1 dans le Tableau II.5).

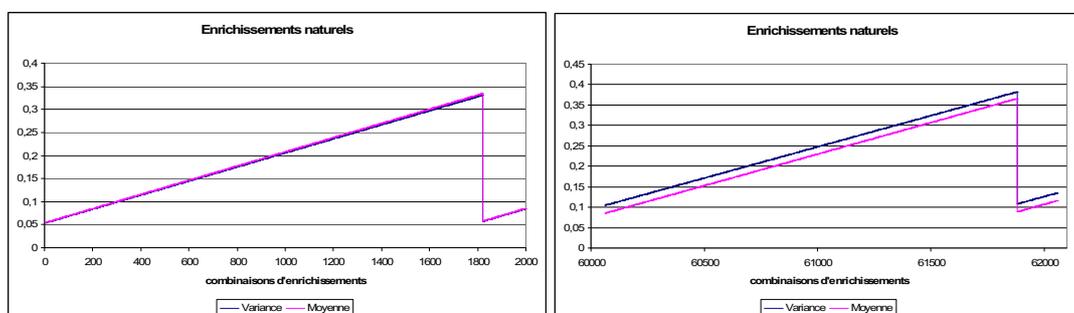


Figure II.11 : Motif principal des variations de la variance et de la moyenne des distributions de masses (combinaisons d'atomes de 1 à 2 000 à gauche et de 60 000 à 62 000 à droite) avec des enrichissements naturels (variation n°1 dans le Tableau II.5).

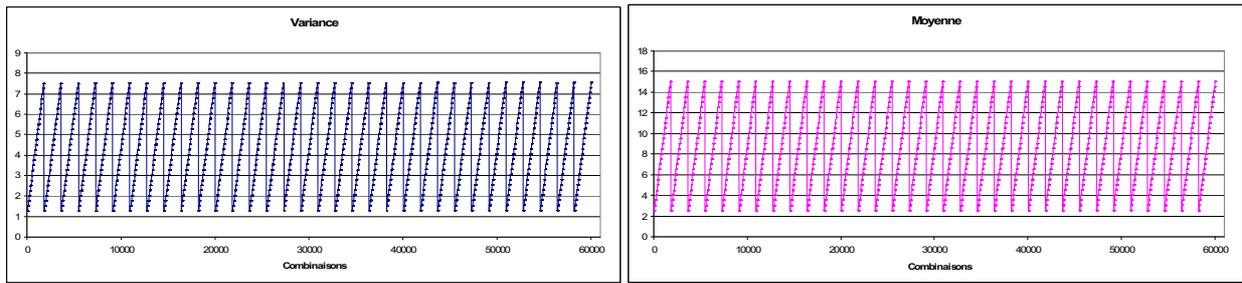


Figure II.12 : Variance (gauche) et moyenne (droite) des distributions de masses pour les 60 000 premières combinaisons d'atomes avec des enrichissements naturels pour ^2H , ^{15}N et ^{18}O et un enrichissement de 50% en ^{13}C (variation n°2 dans le Tableau II.5).

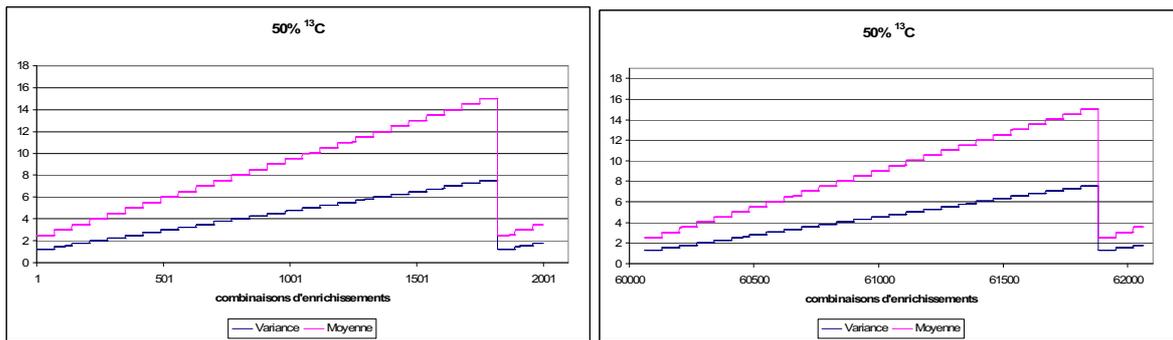


Figure II.13 : Motif principal des variations de la variance et de la moyenne des distributions de masses (combinaisons d'atomes de 1 à 2 000 à gauche et de 60 000 à 62 000 à droite) avec des enrichissements naturels pour ^2H , ^{15}N et ^{18}O et un enrichissement de 50% en ^{13}C (variation n°2 dans le Tableau II.5).

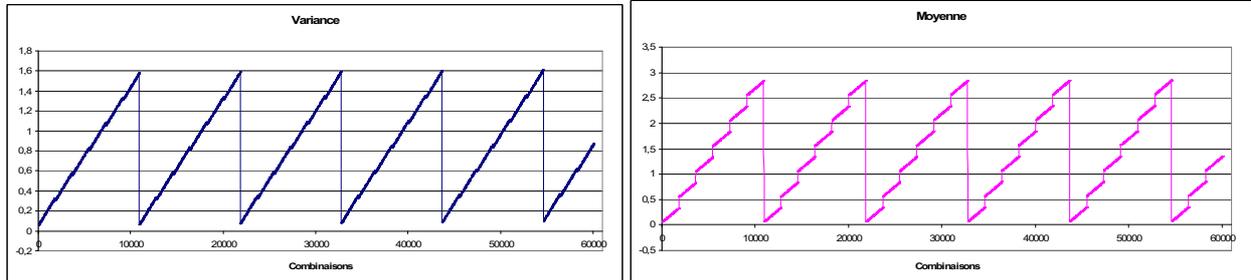


Figure II.14 : Variance (gauche) et moyenne (droite) des distributions de masses pour les 60 000 premières combinaisons d'atomes avec des enrichissements naturels pour ^2H , ^{13}C et ^{18}O et un enrichissement de 50% en ^{15}N (variation n°3 dans le Tableau II.5).

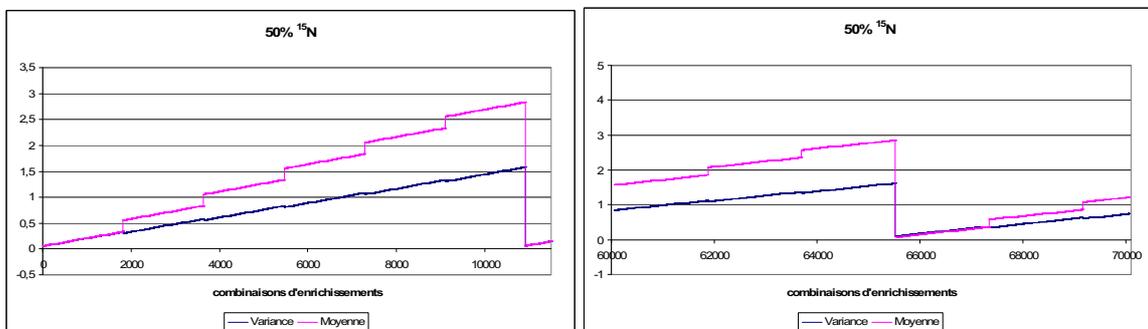


Figure II.15 : Motif principal des variations de la variance et de la moyenne des distributions de masses (combinaisons d'atomes de 1 à 2 000 à gauche et de 60 000 à 62 000 à droite) avec des enrichissements naturels pour ^2H , ^{13}C et ^{18}O et un enrichissement de 50% en ^{15}N (variation n°3 dans le Tableau II.5).

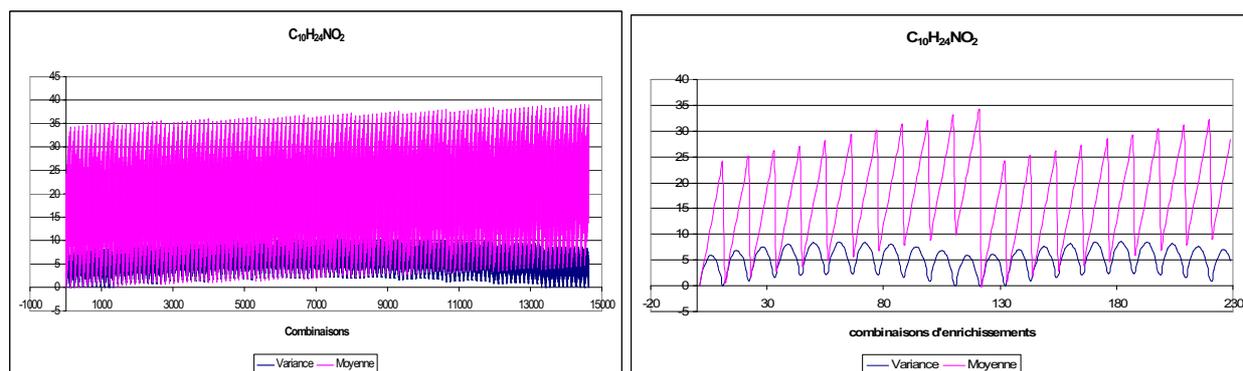


Figure II.16 : Variance et moyenne des distributions de masses d'une molécule de formule brute $C_{10}H_{24}NO_2$ pour les 14 000 combinaisons d'enrichissements en isotopes (gauche) ; motif principal des variations de la variance et de la moyenne des distributions de masses (combinaisons d'enrichissements de 1 à 230) d'une molécule de formule brute $C_{10}H_{24}NO_2$ (droite). Variation n°4 dans le Tableau II.5.

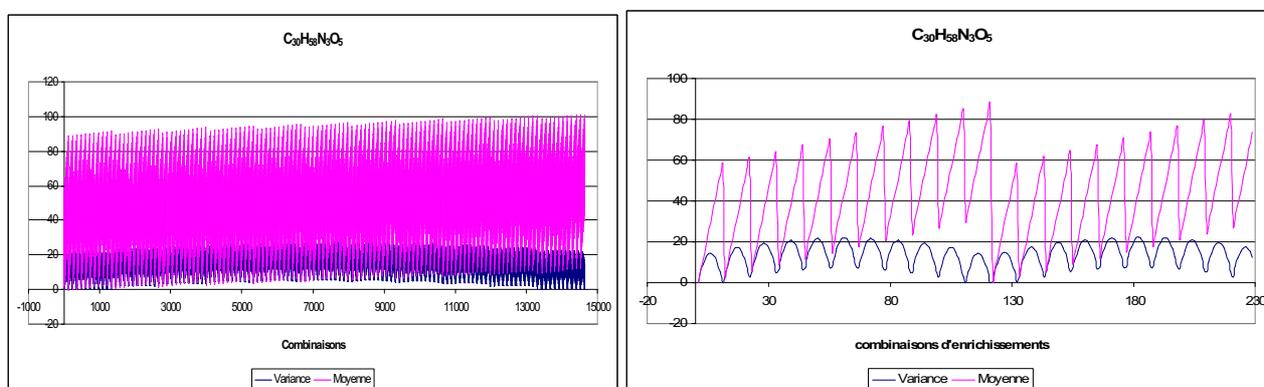


Figure II.17 : Variance et moyenne des distributions de masses d'une molécule de formule brute $C_{30}H_{58}N_3O_5$ pour les 14 000 combinaisons d'enrichissements en isotopes (gauche) ; motif principal des variations de la variance et de la moyenne des distributions de masses (combinaisons d'enrichissements de 1 à 230) d'une molécule de formule brute $C_{30}H_{58}N_3O_5$ (droite). Variation n°5 dans le Tableau II.5.

Dans les graphiques précédents, l'ensemble des variations a d'abord été représenté (toutes les combinaisons sont représentées sur l'axe des abscisses), puis, ces variations étant périodiques, le motif de base a été représenté (sur un nombre plus petit de combinaisons).

Plusieurs commentaires peuvent être faits des variations observées :

- Tout d'abord, quelle que soit la nature de la variation (atomes à enrichissements fixes ou enrichissements à formule brute fixe), moyenne comme variance présente une périodicité. Elle est de 1820 pour les variations n° 1 et 2 des atomes (Figure II.10 à Figure II.13) correspondant à un changement de nombre d'azote : 26 carbones x 70 hydrogènes = 1820 combinaisons. Elle est de 10 920 pour la variation n°3 (Figure II.14 et Figure II.15)

correspondant à un changement de nombre d'oxygènes : 6 azotes x 26 carbones x 70 hydrogènes = 10920 combinaisons. Et elle est de 121 pour la variation d'enrichissements (Figure II.16 et Figure II.17) correspondant à un changement d'enrichissement d'azote : $11 X_C \times 11 X_H = 121$ combinaisons).

- Pour les variations de type 1 (atomes), le motif de base de la moyenne et de la variance a été reporté et se présente comme une courbe (droite ou fonction en escaliers), ayant une pente globalement positive. Cette allure est due, pour les variations n°1 et 2 (Figure II.10 à Figure II.13) à l'augmentation du nombre de carbones, qui, par son enrichissement de 1,08% ou de 50%, est l'enrichissement le plus important et contribue ainsi considérablement à la déviation de la moyenne. Quant à la variation n°3 (Figure II.14 et Figure II.15) cette croissance est due à l'augmentation du nombre d'azotes ayant un enrichissement de 50%. Les « marches en escaliers » des Figure II.13 (respectivement Figure II.15) s'expliquent par l'enrichissement de 50% en ^{13}C (respectivement ^{15}N) qui fait croître la moyenne de 0,5 à chaque atome de carbone (respectivement azote) supplémentaire.
- D'après les formules de la moyenne et de la variance rappelées plus haut, à enrichissements constants, la moyenne et la variance sont des fonctions linéaires des nombres d'atomes, ce qui explique l'allure linéaire de la variation de la moyenne et de la variance pour les Figure II.10, Figure II.12 et Figure II.16. En revanche, lorsque l'enrichissement varie, si la moyenne reste une fonction linéaire des enrichissements, la variance devient une fonction carrée des enrichissements, d'où son allure parabolique (Figure II.16 et Figure II.17 droites)

IV-3. Conclusions

En somme, l'allure des variations de la moyenne et de la variance des distributions en fonction du nombre d'atomes et des enrichissements est conservée que l'on fasse varier un paramètre à la fois ou que l'on fasse varier 4 paramètres ensemble. Ceci nous indique que les paramètres sont bien indépendants les uns des autres et nous permet de prévoir l'allure de la moyenne et de la variance pour une variation simultanée de l'ensemble des huit paramètres. Les moyennes et variances seront semblables aux courbes des Figure II.16 et Figure II.17 de droite pour la variance (produit de convolution d'une droite et d'une parabole = parabole) et aux courbes des Figure II.12 et Figure II.14 de droite pour la moyenne (produit de

convolution d'une fonction croissante en escaliers et d'une fonction linéaire croissante = fonction croissante en escaliers).

En outre, les variations observées sont en accord avec la théorie, ce qui nous permet de valider notre modèle de calcul et nos prévisions. Ce raisonnement élaboré pour la construction théorique d'un spectre de masse pourra donc servir d'appui à la résolution du problème inverse qui est de déterminer, à partir d'une distribution de masse expérimentale, les enrichissements et la formule brute d'un composé.

V. Résolution du problème inverse

Après le calcul des intensités du spectre de masse d'une molécule connue, nous nous sommes intéressés à la démarche inverse, *i.e.*, la construction d'un programme informatique capable, à partir de données caractéristiques d'un spectre de masse expérimental d'une molécule inconnue (moyenne, variance de la distribution...), de fournir en sortie une (ou éventuellement plusieurs) molécule(s) candidate(s), enrichie(s) ou non ayant un spectre de masse dont les caractéristiques sont identiques.

V-1. Éléments de construction du programme C++ du problème inverse

V-1.1. Rappels des notations

- n_N : nombre d'atomes d'azote ;
- n_C : nombre d'atomes de carbone ;
- n_O : nombre d'atomes d'oxygène ;
- n_H : nombre d'atomes d'hydrogène.

- X_N : enrichissement en azote 15;
- X_C : enrichissement en carbone 13 ;
- X_O : enrichissement en oxygène 18 ;
- X_H : enrichissement en deutérium.

- M_{exp} : masse expérimentale de la distribution de masse;
- E_{exp} : moyenne expérimentale de la distribution de masse ;
- V_{exp} : variance expérimentale de la distribution de masse.

V-1.2. Éléments de construction du programme inverse :

« Test_Molecules »

La première contrainte sur les nombres d'atomes, énoncée précédemment, devient avec ces notations :

$$n_H < 2n_N + 2n_C + 2$$

Le principe de détermination des paramètres n_N , n_C , n_O , n_H , X_N , X_C , X_O et X_H consiste à évaluer dans un premier temps une combinaison des nombres d'atomes et de tester les enrichissements qui conviendraient pour obtenir une moyenne et une variance égales aux valeurs expérimentales à 1% près :

- Détermination de la moyenne E_{exp} et de la variance V_{exp} de la distribution expérimentale ;
- n_N , n_C et n_O sont fixés dans une première étape, donc $n_H \in [H_{\text{inf}} ; H_{\text{max}}]$, avec les contraintes imposées ;
- calcul de $M_0 = 14n_N + 12n_C + 18n_O + n_H$ (masse calculée à partir des nombres d'atomes fixés) : $M_0 \in [M_{\text{inf}} ; M_{\text{max}}]$;
- test si $E_{\text{exp}} \pm 1\% \in [M_{\text{inf}} ; M_{\text{max}}]$
 - si non : une nouvelle combinaison n_N , n_C et n_O et donc n_H est testée avec $M_0' \in [M_{\text{inf}}' ; M_{\text{max}}']$;
 - si oui : une combinaison d'enrichissements X_N , X_C , X_O et X_H est testée, donc on obtient $[M_{\text{inf}}' ; M_{\text{max}}']$ et on teste si $E_{\text{exp}} \pm 1\% \in [M_{\text{inf}}' ; M_{\text{max}}']$.
 - si non : une autre combinaison d'enrichissements X_N' , X_C' , X_O' et X_H' est testée ;
 - si oui : la variance V_0 de cette distribution trouvée est calculée et V_{exp} est testée : $V_{\text{exp}} \pm 1\% = V_0$.
- Chaque combinaison (n_N , n_C , n_O , n_H , X_N , X_C , X_O , X_H) est conservée en mémoire et placée dans une liste qui contiendra toutes les solutions possibles.

Ainsi, à partir du spectre expérimental enregistré (en réalité il s'agit d'une moyenne de plusieurs spectres), nous extrayons les intensités du massif spectral d'intérêt et rentrons les masses (m/z) et les intensités spectrales dans le programme qui calcule la moyenne et l'écart type avant de tester toutes les combinaisons des paramètres en suivant le cheminement décrit ci-dessus. Il est possible de fixer certains des paramètres : si la molécule est connue, on fixe

n_N , n_C , n_O et n_H aux valeurs caractéristiques du composé et le programme ne fera varier que les paramètres relatifs aux enrichissements. Inversement si les enrichissements sont connus, les paramètres X_N , X_C , X_O et X_H sont fixés et seuls les nombres d'atomes varient.

Une variante de ce programme appelée « Test_Molecules_KL » utilise la notion de Divergence de Kullback-Leibler (D_{K-L}), qui permet d'estimer la divergence (différence) entre deux distributions, une distribution expérimentale et une distribution théorique calculée.

Pour des distributions P et Q de variables aléatoires discrètes, la divergence D_{K-L} de Q à P

$$\text{est : } D_{KL}(P||Q) = \sum_i P(i) \log \frac{P(i)}{Q(i)}$$

Pour des distributions P et Q d'une variable aléatoire continue :

$$D_{KL}(P||Q) = \int_{-\infty}^{+\infty} p(x) \log \frac{p(x)}{q(x)} dx$$

où p et q représentent les densités de P et Q .

$P(i)$ sont les probabilités de la distribution expérimentale et $Q(i)$, les probabilités calculées.

Les principales étapes de calcul de cette variante de programme sont les suivantes :

- Calcul de $\sum_i P(i) \log(P(i))$ et de E_{exp} ;
- n_N , n_C et n_O sont fixés, donc $n_H \in [H_{\text{inf}} ; H_{\text{max}}]$, avec les contraintes imposées ;
- calcul de $M_0 = 14n_N + 12n_C + 18n_O + n_H$ (masse calculée à partir des nombres d'atomes fixés) : $M_0 \in [M_{\text{inf}} ; M_{\text{max}}]$;
- si $E_{\text{exp}} \pm 1\% \in [M_{\text{inf}} ; M_{\text{max}}]$, une combinaison d'enrichissements X_N , X_C , X_O et X_H est testée, donc on obtient $[M_{\text{inf}}' ; M_{\text{max}}']$;
- si $E_{\text{exp}} \pm 1\% \in [M_{\text{inf}}' ; M_{\text{max}}']$, calcul des $Q(i)$ avec ces paramètres (n_N , n_C , n_O , n_H , X_N , X_C , X_O , X_H) ;

- calcul de D_{K-L} qui est associée à un score qui est stocké dans une liste triée au fur et à mesure (chaque nouveau score est comparé à ceux déjà présents et rangés par ordre croissant dans la liste).

On obtient ainsi une liste de molécules candidates potentielles rangées par ordre décroissant de similarité entre les distributions.

V-2. Résultats expérimentaux

Afin de tester les différents programmes décrits ci-dessus, nous avons réalisé les spectres expérimentaux de différents composés dont les enrichissements en ^{13}C et/ou ^{15}N étaient ou non connus. Nous avons alors comparé ces spectres aux spectres théoriques attendus, puis nous avons déterminé le ou les enrichissements correspondant à la distribution expérimentale, en espérant retrouver les valeurs attendues.

V-2.1. Acide Mycophénolique (AMP)

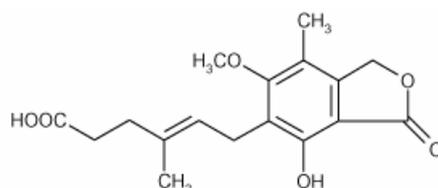


Figure II.18 : Acide Mycophénolique $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (AMP).

Nous disposons de plusieurs composés enrichis en ^{13}C , dont l'AMP (Figure II.18). Les enrichissements en ^{13}C se faisant par un procédé « naturel » détaillé au chapitre IV, les valeurs fournies correspondaient à des estimations et ne tenaient pas compte d'éventuelles pertes au niveau du processus d'enrichissement lui-même. Les valeurs initialement données étaient alors 1,08% (enrichissement naturel), 10%, 50 et 100% de ^{13}C . Nous avons donc fait le spectre de masse expérimental des quatre AMP enrichis :

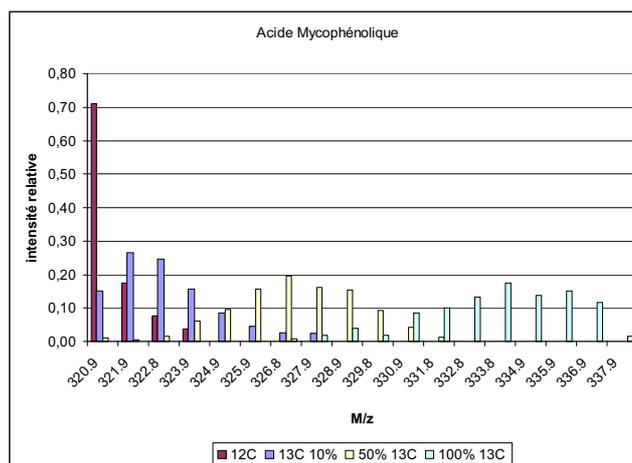


Figure II.19 : Spectres de masse expérimentaux de l'acide mycophénolique à différents taux d'enrichissement en ^{13}C annoncés initialement. Violet : enrichissement naturel ; bleu : 10% ^{13}C ; jaune : 50% ^{13}C ; azur : 100% ^{13}C .

A première vue, l'enrichissement annoncé à 100% ne correspond pas au spectre expérimental (spectre azur Figure II.19). En effet, en construisant à l'aide du programme R auparavant élaboré (*cf* partie précédente) les spectres théoriques des AMP enrichis avec les enrichissements en ^{13}C annoncés, nous obtenons les allures suivantes :

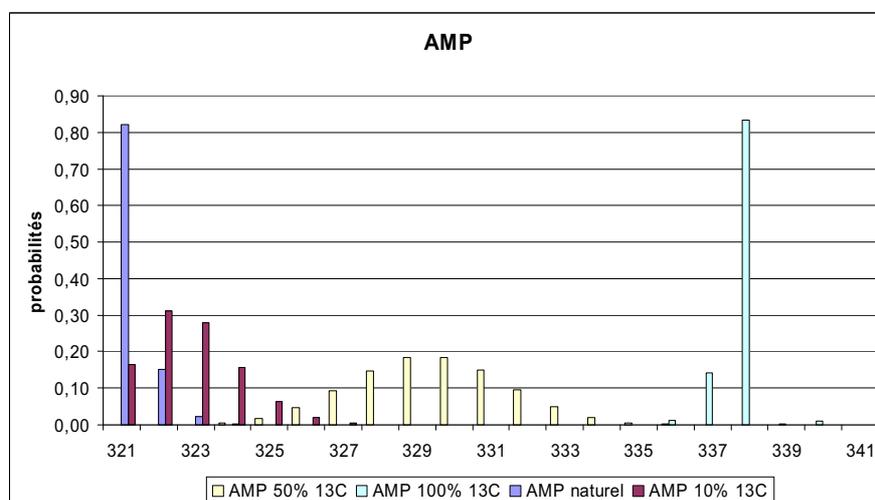


Figure II.20 : Spectres de masse théoriques de l'acide mycophénolique à différents taux d'enrichissement en ^{13}C escomptés.

Toutes les intensités ont été calculées d'après la formule 1 énoncée précédemment. L'enrichissement naturel de ^{13}C est représenté en bleu, le 10% est représenté en rouge, le 50% en jaune et le 100% en azur.

En effet, à partir des intensités expérimentales des spectres de masse de l'AMP (normalisées) le programme « Test_Molecules » (procédure décrite au paragraphe V-1.2) estime à 76% l'enrichissement en ^{13}C pour l'AMP noté 100%, et 37%, celui noté à 50%.

Par ailleurs, plusieurs remarques peuvent être formulées en observant ces spectres :

- les intensités relatives des pics à m/z 320,9 (pic de la molécule complètement ^{12}C) sont respectivement de 15%, 0,9% et 0% pour l'enrichissement à 10%, 37% et 75%. Quant aux rapports $I_{12\text{C}}/I_{\text{max}}$, ils sont respectivement de 57%, 4% et 0% pour l'enrichissement à 10%, 37% et 76%.
- enfin, d'après les abaques présentés en Figure II.6, une molécule contenant 17 atomes de carbone, doit être enrichie au minimum à 47% de ^{13}C pour avoir un rapport $I_{12\text{C}}/I_{\text{max}}$ inférieur ou égal à 0,0001, si elle n'est enrichie qu'en ^{13}C .

Ces valeurs seront intéressantes à considérer pour une éventuelle utilisation de l'AMP enrichi comme standard interne.

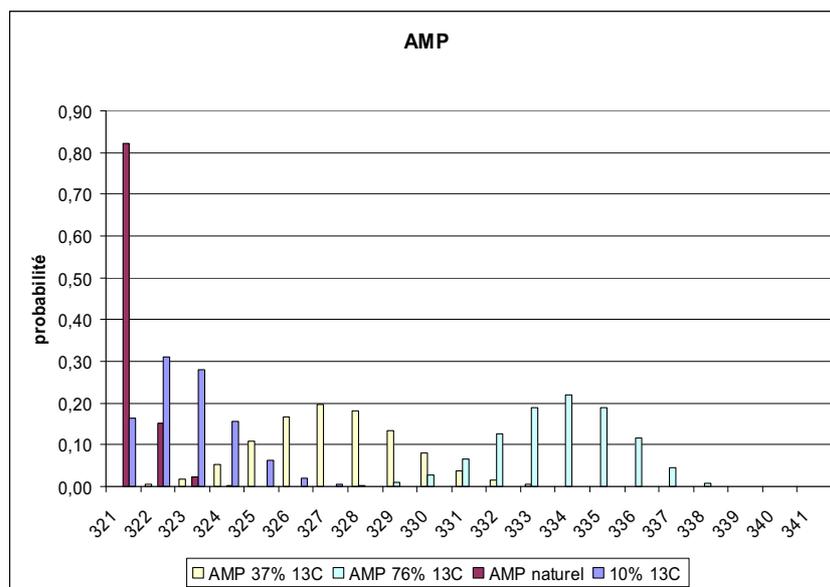


Figure II.21 : Spectres de masse théoriques de l'AMP pour un enrichissement naturel, à 10, 37 et 76% de ^{13}C .

Rouge : enrichissement naturel en ^{13}C (1,08%) ; bleu : 10% ^{13}C ; jaune : 37% ^{13}C ; azur : 76% ^{13}C .

On constate que l'allure des spectres expérimentaux (Figure II.21) est très voisine de celle des spectres théoriques calculés pour les enrichissements déterminés à partir des données expérimentales :

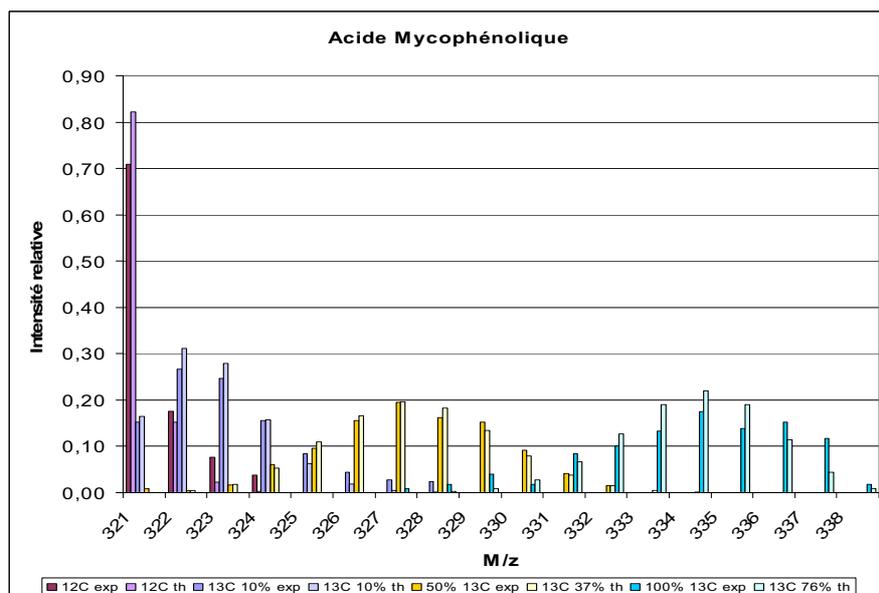


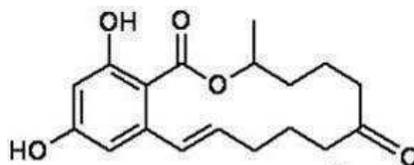
Figure II.22 : Comparaisons des spectres de masse théoriques (th) et expérimentaux (exp) de l'AMP pour différents enrichissements au ^{13}C .

Afin d'estimer l'écart entre les spectres expérimentaux et les spectres théoriques calculés, les intensités du pic majoritaire du spectre théorique et du spectre expérimental sont superposées et ajustées artificiellement (pic à m/z 327 dans le cas de l'AMP à 37% de ^{13}C). La moyenne des écarts absolus entre les intensités des pics est alors de l'ordre de 10%.

Enfin, la teneur isotopique en ^{13}C de la biomasse ayant servi de substrat aux micro-organismes responsables de la formation de l'AMP était de l'ordre de 38% et de 75% pour les enrichissements annoncés initialement à 50% et 100%¹ respectivement, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que ceux déterminés à partir des spectres expérimentaux par notre programme. Cela signifie qu'il n'y aurait pas de discrimination isotopique au niveau du micro-organisme (*Penicillium brevicompactum*) pour la synthèse de l'AMP ou du moins que celle-ci serait inférieure à 1%.

¹ Les écarts entre les enrichissements mesurés sur la biomasse et les enrichissements attendus proviennent d'une remobilisation du ^{12}C au cours de la croissance de la plante. En effet le ^{13}C n'a été appliqué qu'au moment de la floraison et non depuis le début de la croissance. Pour plus de détails, cf chapitre IV.

V-2.2. Zéaralénone (ZEN)

Figure II.23 : Zéaralénone $C_{18}H_{22}O_5$

Nous disposons également de ZEN ayant a priori les mêmes enrichissements que l'AMP précédent, puisque ces deux produits ont été produits en utilisant le même substrat enrichi (grains de blé). Les enrichissements annoncés étaient donc les mêmes, à savoir 1,08, 10, 50 et 100% de ^{13}C . Notre démarche a été identique à celle que nous avons suivie pour l'AMP, *i.e.*, nous avons fait le spectre expérimental de chaque échantillon de ZEN enrichie et nous les avons comparés aux spectres théoriques attendus de ZEN enrichie à 1,08, 10, 50 et 100% de ^{13}C .

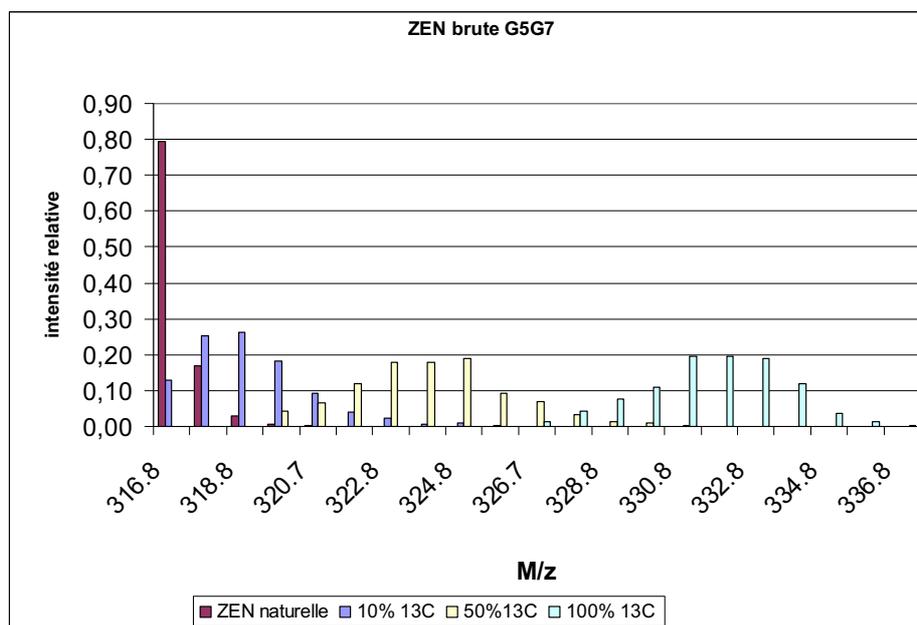


Figure II.24 : Spectres de masse expérimentaux de la ZEN brute synthétisée sur blé enrichi au ^{13}C , par *Fusarium culmorum*

Rouge : enrichissement naturel en ^{13}C (1,08%) ; bleu : enrichissement à 10% ^{13}C ; jaune : enrichissement annoncé à « 50% » ^{13}C ; azur : enrichissement annoncé à « 100% » ^{13}C .

La distribution des intensités semble correspondre avec les distributions théoriques attendues pour la ZEN naturelle (1,08% de ^{13}C) et la ZEN enrichie à 10% de ^{13}C , mais, comme pour

l'AMP, elles ne sont pas en accord avec les enrichissements annoncés de 50 et 100%. En effet, la production de ZEN ayant été obtenue à partir du même lot de blé enrichi à « 50% » et « 100% » de ^{13}C , les enrichissements effectifs devraient être du même ordre de grandeur que ceux déterminés pour l'acide mycophénolique, *i.e.* de l'ordre de 38 et 75%. Néanmoins en utilisant notre programme « Test_Molécules » (procédure décrite au paragraphe V-1.2), pour calculer les enrichissements correspondant aux spectres expérimentaux à partir de plusieurs mesures spectrales pour chaque enrichissement, nous trouvons des résultats différents : 39% et 81%, qui semblent correspondre effectivement, si l'on compare les distributions expérimentales et théoriques pour ces enrichissements (Figure II.25).

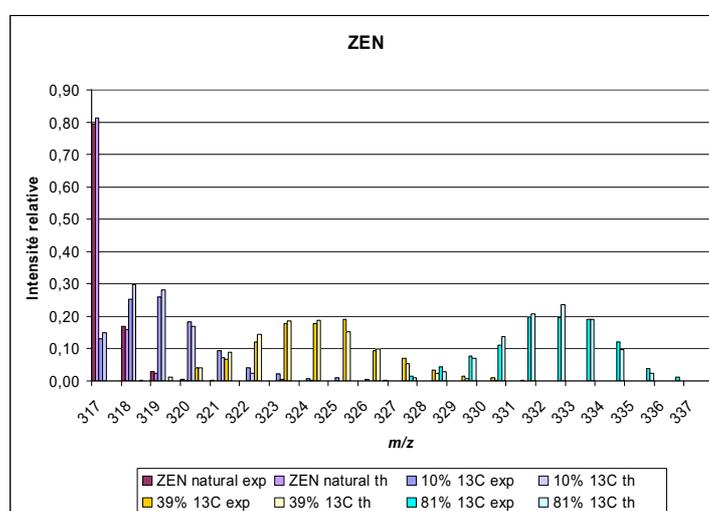


Figure II.25 : Comparaisons des spectres de masse théoriques (th) et expérimentaux (exp) de la ZEN pour différents enrichissements au ^{13}C .

A ce stade, nous sommes tentés de penser que le micro-organisme responsable de la production de ZEN (*Fumigatus culmorum*) n'utilise pas les substrats de blé enrichis en ^{13}C de la même manière que le micro-organisme responsable de la synthèse de l'AMP (*Penicillium brevicompactum*) puisqu'à partir des mêmes grains de blé enrichis, les produits secondaires produits par les champignons n'ont pas les mêmes enrichissements finaux en ^{13}C .

V-2.3. Grains de blé enrichis

Ces derniers résultats nous poussent à vérifier les enrichissements des grains de blé ayant servi de substrat aux champignons responsables de la production des deux précédents composés. Les enrichissements annoncés des grains de blé ayant servi de substrat à la culture de *Fumigatus culmorum* pour la production de ZEN et à *Penicillium brevicompactum* pour la

production de l'AMP sont de 10, 38 et 75% de ^{13}C (la détermination a été faite à Cadarache par M. Péan en mesurant le rapport de $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ par combustion). Nous cherchions ici à confirmer ces teneurs en repérant un produit isolé contenu dans les extraits des grains de blé à chaque enrichissement et en déterminant les enrichissements à partir des spectres de masse expérimentaux, grâce à « Test_Molecules » (procédure décrite au paragraphe V-1.2).

Les grains de blé appartiennent à différentes espèces de blé suivant les cultures :

- Ardente pour l'enrichissement à 10% de $^{13}\text{CO}_2$;
- Cap Horn pour l'abondance naturelle et les enrichissements initialement appliqués de 50 et 100% $^{13}\text{CO}_2$.

Quelques grammes de chaque blé enrichi ont été broyés puis extraits avec un mélange eau (50%), ACN (25%) et méthanol (25%), puis placés pendant 24 heures à 4°C. Enfin 200 μL du surnageant ont été prélevés et analysés par LC-MS en mode positif (ajout d'un H pour former un ion moléculaire MH^+ chargé positivement) et négatif (arrachement d'un H pour former un ion moléculaire M^- chargé négativement).

- Mode positif : aucun produit ne fournit de signal exploitable en ionisation positive.
- Mode négatif : un composé de masse m/z 448 ($\text{M}-\text{H} = m/z$ 447) est présent dans tous les échantillons de blé.

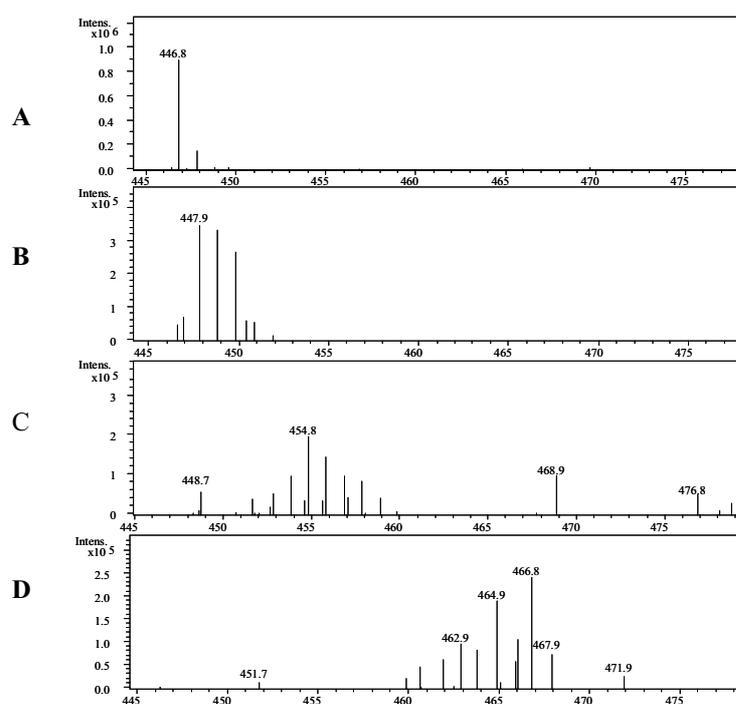


Figure II.26 : Spectres de masse d'extraits (A) de blé naturel (Cap Horn), (B) enrichi à 10% de $^{13}\text{CO}_2$ (Ardente), (C) enrichi à 50 et (D) 100% de $^{13}\text{CO}_2$ (Cap Horn).

Les intensités de chacun des spectres de masse sont utilisées pour déterminer les enrichissements de ce composé inconnu, supposé être enrichi comme les grains de blé, *i.e.* à 10, 38 et 75% de ^{13}C pour les cultures enrichies.

Ici aussi nous utilisons le programme « Test_Molecules » permettant de calculer les enrichissements en ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N ou ^2H à partir d'un spectre de masse expérimental. Ce programme utilise la fonction « Test_Molecules_KL », dont les modalités ont été précisées au paragraphe V-1.2.

En imposant un poids moléculaire de 448, plusieurs formules brutes correspondent à des enrichissements proches des enrichissements mesurés par combustion dans les grains de blé. Les formules trouvées sont les suivantes : $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_9\text{N}_4$, $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_{11}\text{N}_2$, $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{N}_2$, $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_8\text{N}_4$, $\text{C}_{19}\text{H}_8\text{O}_8\text{N}_6$, $\text{C}_{19}\text{H}_4\text{O}_{10}\text{N}_4$, $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_{13}$.

Toutes ces formules répondent aux enrichissements naturels, et aux enrichissements de 9-10%, de 39-43% et de 75-77% de ^{13}C . Sachant que l'erreur commise par les calculs d'enrichissement est inférieure à 10%, nous pouvons affirmer que nous retrouvons les mêmes enrichissements que les enrichissements déterminés expérimentalement.

Parmi les formules brutes listées précédemment, l'une a plusieurs isomères référencés au National Cancer Institute (NCI) : NSC226847 ou NSC79287.

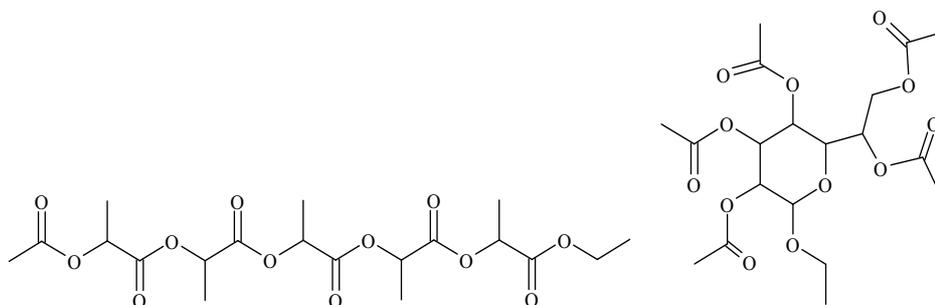


Figure II.27 : $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$

Nous en déduisons donc que les enrichissements des grains de blé ayant servi de support à la croissance des micro-organismes responsables de la formation de ZEN et d'AMP sont enrichis, comme les mesures de $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ l'indiquaient, à 10, 38 et 75% de ^{13}C .

Néanmoins, il convient de préciser à ce stade que notre programme de calculs d'enrichissement n'est réellement efficace que lorsque l'on souhaite déterminer les enrichissements d'un composé dont la formule brute est connue sans ambiguïté, ou au

contraire lorsque l'on souhaite déterminer la formule brute d'un composé dont les enrichissements en ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N et ^2H sont précisément connus. En effet, si les enrichissements et la formule brute sont à déterminer, un très grand nombre de solutions peut convenir. En revanche, pour une formule brute donnée, seulement peu de combinaisons d'enrichissements de ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N et ^2H sont compatibles avec un spectre expérimental. C'est donc une approche possible pour la détermination de composés naturels inconnus (retrouvés par exemple dans des extraits bruts de cultures) à partir de plusieurs spectres de cette molécule enrichie à différents taux connus de ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N et ^2H . Si cette approche est onéreuse (coût des enrichissements) par rapport à une approche plus traditionnelle (MS, IR, RMN etc. de la molécule naturelle), elle permet de s'affranchir de problèmes de pureté qui sont inhérents à ces dernières.

V-2.4. Fumonisines (FB1 et FB2)

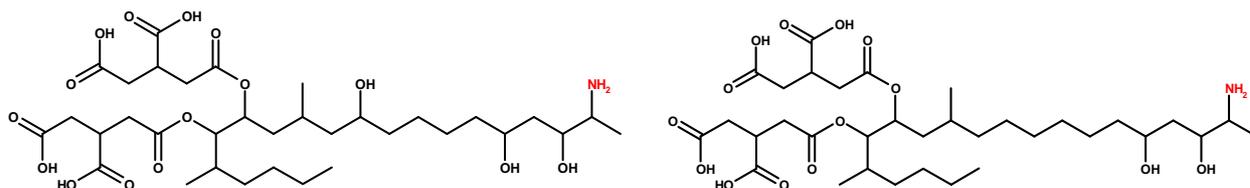


Figure II.28 : Fumonisines FB1 (gauche) et FB2 (droite).

Comme précédemment, nous avons enregistré les spectres expérimentaux de la Fumonisine B1 (FB1, de formule brute $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$ et de masse 721) et de la Fumonisine B2 (FB2, de formule brute $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$ et de masse 705), à divers taux d'enrichissements connus en ^{13}C et ^{15}N . Les solutions étudiées sont :

- une solution standard enrichie naturellement ;
- une solution contenant de la fumonisine B1 et B2 brute formée par des micro-organismes cultivés sur des grains de maïs naturels ;
- une solution contenant de la fumonisine B1 et B2 brute enrichie à 10% de ^{15}N et 2% de ^{13}C ;
- une solution contenant de la fumonisine B1 et B2 brute enrichie à 10% de ^{15}N et 4,8% de ^{13}C ;
- deux solutions contenant de la fumonisine B1 et B2 brutes (solutions appelées brut 4 et 5) enrichies à 10% de ^{15}N et 10% de ^{13}C . En effet la fumonisine B2 est synthétisée avec

la fumonisine B1 ; *i.e.* les solutions brutes, enrichies ou non en ^{13}C et ^{15}N , produites par les champignons contiennent les deux produits.

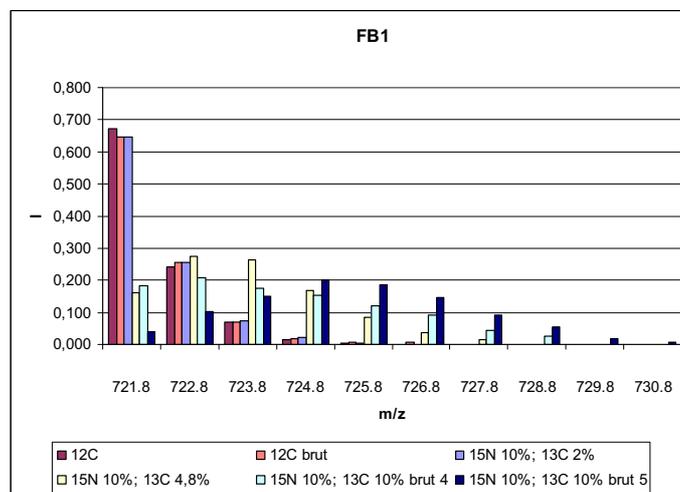


Figure II.29 : Spectres de masse expérimentaux de la fumonisine FB1 à divers taux d'enrichissements en ^{13}C et en ^{15}N (en ordonnées : I = Intensité).

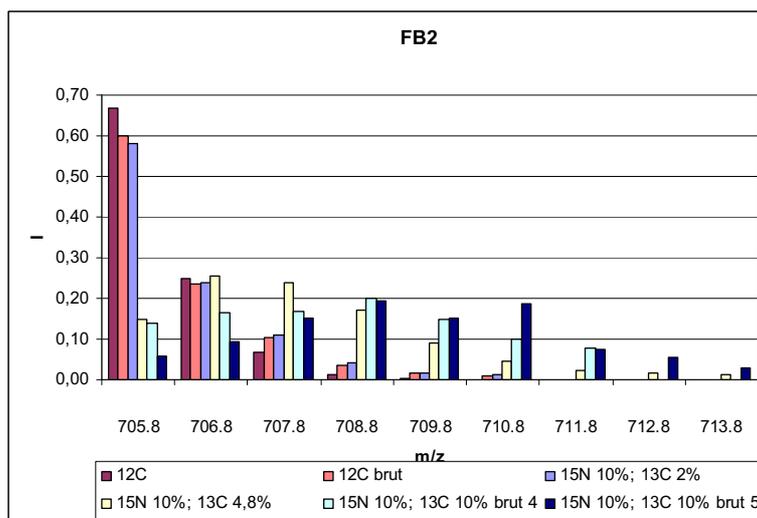


Figure II.30 : Spectres de masse expérimentaux de la fumonisine FB2 à divers taux d'enrichissements en ^{13}C et en ^{15}N (en ordonnées : I = Intensité).

Nous avons d'abord construit les spectres théoriques de la fumonisine B1 et B2 enrichies avec les valeurs annoncées en ^{13}C et ^{15}N afin de pouvoir les comparer aux spectres expérimentaux enregistrés et déceler une différence comme nous avons pu l'observer pour les échantillons précédents (AMP et ZEN) :

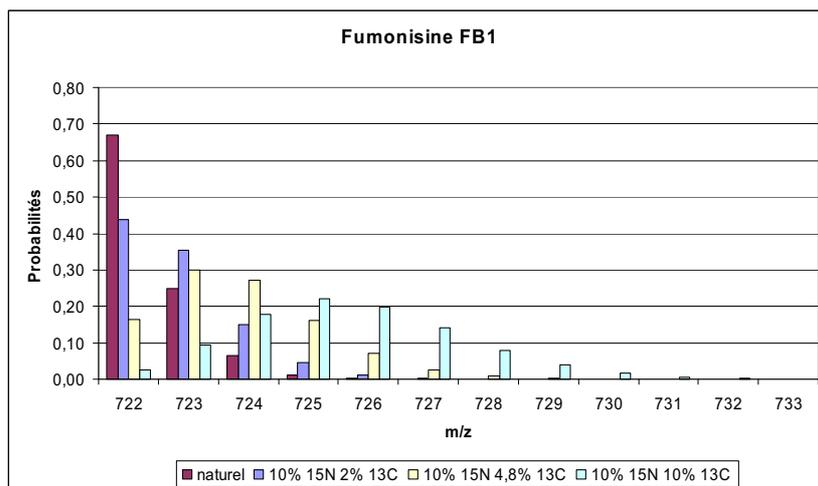


Figure II.31 : Spectres de masse théoriques de la fumonisine FB1 à divers taux d'enrichissements en ^{13}C et en ^{15}N .

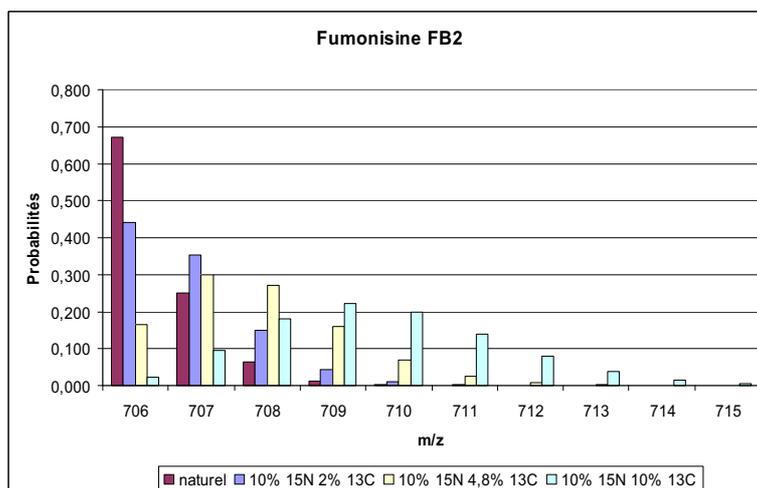


Figure II.32 : Spectres de masse théoriques de la fumonisine FB2 à divers taux d'enrichissements en ^{13}C et en ^{15}N .

Ici aussi nous pouvons constater un écart entre les enrichissements annoncés et les enrichissements réels des composés. Pour déterminer les enrichissements en ^{13}C et ^{15}N , nous utilisons le programme « Test_Molecules », en imposant les compositions des molécules et un pas de 1% sur l'enrichissement en ^{13}C . Les meilleurs scores sont obtenus pour 10% de ^{13}C avec 10% ^{15}N ou 11% de ^{13}C et 0,4% de ^{15}N pour le brut 4, et 7% de ^{13}C avec 10% ^{15}N ou 7% de ^{13}C et 0,4% de ^{15}N pour le brut 5.

Plus précisément, en prenant un pas de 0,2% pour le ^{13}C et le ^{15}N et une tolérance de 0,1% pour la divergence de Kullback-Leibler, on obtient plusieurs solutions présentées dans le

Tableau II.6. En faisant la moyenne des enrichissements de ces 10 meilleurs scores retenus par le programme, nous obtenons 8% de ^{15}N et 10% de ^{13}C .

Tableau II.6 : Résultats proposés par le programme de calcul des enrichissements pour la FB2.

Rang	Score	Formule brute	x_{O}	x_{N}	x_{C}	x_{H}
10	0,04635	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,046	0,104	$x_{\text{H}}=0,000$
9	0,04632	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,048	0,104	$x_{\text{H}}=0,000$
8	0,04628	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,049	0,104	$x_{\text{H}}=0,000$
7	0,04625	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,051	0,104	$x_{\text{H}}=0,000$
6	0,04622	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,114	0,102	$x_{\text{H}}=0,000$
5	0,04622	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,053	0,104	$x_{\text{H}}=0,000$
4	0,0462	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,116	0,102	$x_{\text{H}}=0,000$
3	0,04618	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,117	0,102	$x_{\text{H}}=0,000$
2	0,04616	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,119	0,102	$x_{\text{H}}=0,000$
1	0,04613	O14_N01_C34_H59	$x_{\text{O}}=0,002$	0,121	0,102	$x_{\text{H}}=0,000$
Moyennes				0,0834	0,103	

La première colonne contient le rang (le meilleur est en bas de colonne), la seconde colonne le score calculé par la divergence de Kullback-Leibler puis la composition et les enrichissements.

Les solutions proposées présentent des combinaisons d'enrichissements $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ variables mais les scores les caractérisant ne diffèrent que de 0,0002 au plus. En faisant les moyennes sur les enrichissements proposés, nous retrouvons bien 10% de ^{13}C , mais seulement 8% de ^{15}N . Ce dernier résultat n'est pas étonnant puisque la FB2 ne contient qu'un atome d'azote donc une variation d'enrichissement ^{15}N sera très peu sensible sur la masse ($\Delta^{15}\text{N} = 1 \Rightarrow \Delta.M = 1 = 0,1\% M$). Ceci nous indique que le programme est d'autant plus capable de retrouver les enrichissements expérimentaux que le nombre d'atomes est grand. D'autre part on ne peut espérer obtenir une meilleure précision que 1% sur les enrichissements alors même que les données expérimentales ne sont obtenues qu'avec une précision de 0,1 sur la masse.

VI. Conclusions et perspectives

De ceci, nous en concluons que la stratégie optimale sera de :

1. déterminer les enrichissements exacts d'une molécule connue (molécule de référence connue pour être synthétisée par un type donné de champignon dans des conditions expérimentales données), connaissant les enrichissements isotopiques initiaux qui ont été appliqués (^{13}C et/ ou ^{15}N dans notre cas) ;
2. puis, une fois ces enrichissements connus, il sera alors possible de déterminer la formule brute d'un composé inconnu formé dans des conditions expérimentales

proches (même champignon et même substrat) de celle de la molécule de référence ayant servi pour les calculs des enrichissements effectifs.

Néanmoins, dans la mesure où toute la méthode de comparaison (entre moyennes et variances ou entre les probabilités des distributions elles mêmes) s'appuie sur les données expérimentales, il est nécessaire d'affiner les résultats expérimentaux en évaluant l'erreur commise par le spectromètre lors de l'acquisition et de la détection des masses expérimentales du composé à déterminer.

Pour cela, nous avons fait appel à Vincent Picaud, du laboratoire de modélisation, mesure et analyse du CEA de Saclay¹, qui a développé un outil informatique capable d'extraire les pics d'un spectre brut par la méthode des ondelettes et de déterminer les massifs isotopiques présents. Le principe est globalement le suivant :

- Transformée de Fourier du signal brut;
- Extraction des pics par la méthode des ondelettes : dérivée seconde du spectre et application d'un seuil pour éliminer le bruit ;
- Repérage de clusters : pour un ensemble de valeurs c (= charge = z), il recherche dans le spectre l'ensemble des pics $\{P_i, P_j\}$ tels que la différence de leur hauteur soit égale à $1/c$. Cette étape génère un grand nombre de clusters possibles, se recouvrant ;
- Sélection des clusters possibles : les clusters aberrants, de moins de deux pics ou ceux partageants un ou plusieurs pics ou des clusters « croissants » (dont l'intensité des pics croît), etc. sont éliminés.
- Création d'un fichier type « pdf » où figurent la liste des pics et celle des clusters, ainsi qu'un fichier « gnuplot » avec le spectre présentant le spectre initial (rouge), les pics extraits (en vert) et les clusters retenus (en bleu).

Nous avons testé leur programme sur une molécule bien connue de nous : la ZEN enrichie à 10% de ¹³C et de la ZEN naturelle.

¹ DRT/LIST/DeTeCS/SSTM/L2MA

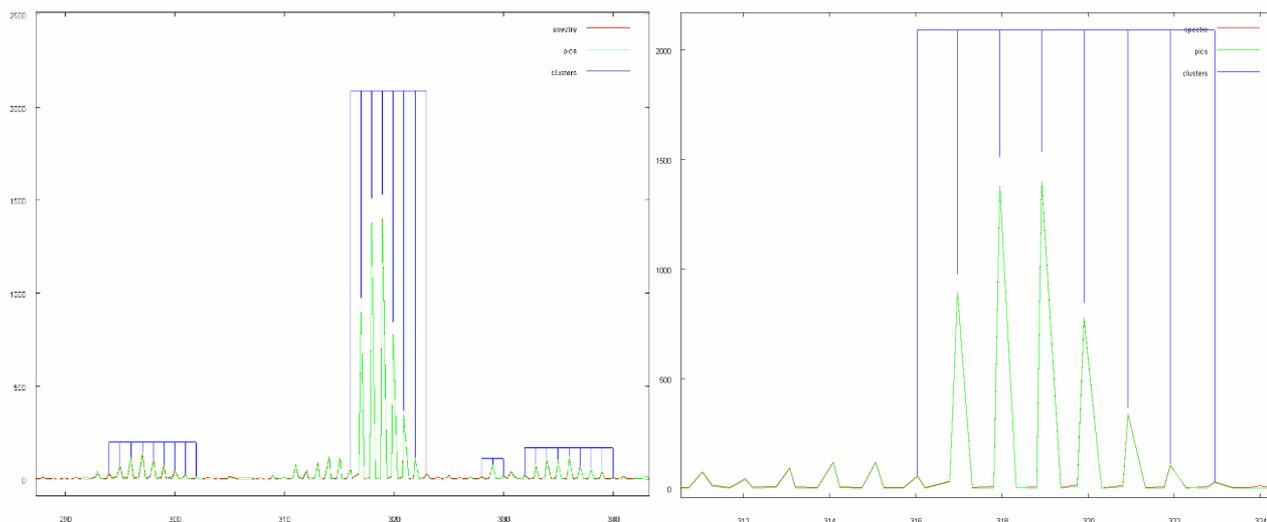


Figure II.33 : Spectre de la ZEN 10% ^{13}C traité par le programme de V. Picaud avec extraction des pics principaux et reconnaissance de clusters isotopiques. Gauche : zoom entre m/z 290 et m/z 340; droite : zoom du cluster isotopique correspondant à la masse de la ZEN 10% ^{13}C .

Le programme retrouve le cluster de la ZEN, et dans le cas la ZEN enrichie à 10%, nous permet d'accéder à des pics que nous n'avions pas vus avec le logiciel de traitement de spectres développé et commercialisé par Bruker (DataAnalysis®).

Il faut néanmoins retirer le premier pic associé au cluster de la ZEN (pic à m/z 315,91 pour la ZEN naturelle et pic à m/z 316,05 pour la ZEN enrichie) : il s'agit d'un artefact dû au logiciel de reconnaissance des clusters. En effet la différence de masse est du même ordre de grandeur entre ce premier pic et le pic suivant (vers m/z 317) et celle qu'il y a entre deux pics consécutifs dans le reste du massif isotopique. Cet artefact pourra être éliminé en modifiant certains paramètres du programme (limiter l'intervalle d'erreur admise entre différence de masses de pics voisins...).

Comparaison avec le logiciel DataAnalysis® de Bruker :

Dans l'exemple précédent de la ZEN, la recherche de massifs isotopiques s'est montrée efficace pour retrouver le massif de la ZEN enrichie ou non au ^{13}C , en prenant soin de supprimer le premier pic que le programme attribue à tort à la ZEN. Dans le cas de l'acide mycophénolique enrichi à 10% de ^{13}C , le programme s'avère moins performant que le logiciel d'exploitation de spectres fourni par Bruker (DataAnalysis®) :

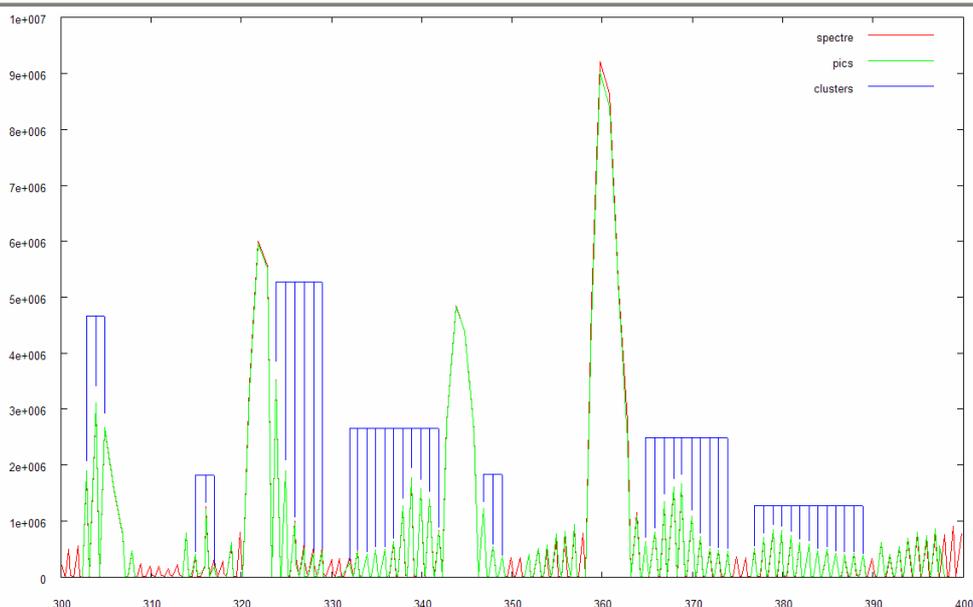


Figure II.34 : Spectre de masse reconstruit par le programme de recherche de massifs isotopiques pour un échantillon d'acide mycophénolique enrichi à 10% de ^{13}C .

On constate que le pic à m/z 321 de l'acide mycophénolique n'a pas été reconnu par le programme qui forme un cluster avec un premier pic à m/z 329,9. En revanche, l'analyse du spectre de masse par le logiciel DataAnalysis®, montre un massif isotopique commençant bien à m/z 321 (m/z 320,9), comme la théorie le prévoit¹ :

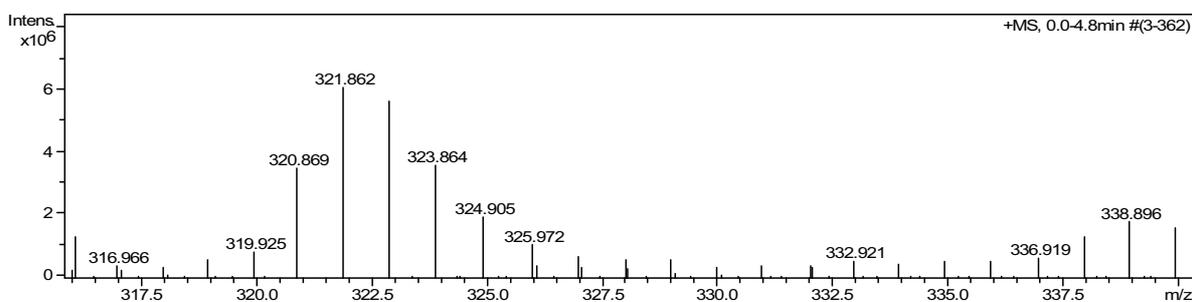


Figure II.35 : Spectre de masse de l'acide mycophénolique enrichie à 10% de ^{13}C .

Parmi les résultats fournis par notre programme pour des molécules connues, nous retrouvons globalement les enrichissements expérimentaux mais ces derniers n'ont pas toujours les meilleurs scores, *i.e.* ce ne sont pas toujours les plus probables d'après nos calculs. Afin de limiter la liste des solutions proposées, deux stratégies sont envisageables :

¹ Voir Figure II.19, spectre bleu.

- La première est d'imposer la formule brute et de rechercher uniquement les enrichissements. Cette approche semble réaliste dans la mesure où l'expérimentateur a, la plupart du temps, une idée de la nature des molécules potentiellement présentes dans son échantillon enrichi. Il pourra ainsi rechercher une molécule donnée sans connaître son enrichissement, ou tester la présence ou non de molécules connues enrichies ou non.
- La seconde, est d'obtenir des données expérimentales plus précises afin d'être plus proche des données théoriques. Ceci est envisageable avec un spectromètre haute résolution de type Orbitrap, proposant une précision en masse de l'ordre du ppm. Ces données, analysées par le programme de recherche de clusters isotopiques, devraient fournir une distribution expérimentale exacte, plus proche de la distribution théorique que nous obtenons actuellement. Ainsi, la divergence D_{K-L} que nous estimons pour comparer les deux distributions fournirait un score très faible, *i.e.*, la molécule solution sortirait dans les premiers scores et serait donc facilement repérable.

C'est pourquoi nous pouvons affirmer que le programme de calcul d'enrichissements ou de détermination de formules brutes (identifications de composés) est un programme fiable et dont l'intérêt expérimental est d'autant plus grand que la précision des appareils de mesure de spectre de masse devient de plus en plus importante (développement de la haute résolution : l'Orbitrap, la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR), etc.). Les limitations que nous avons pu rencontrer et qui ont été mises en évidence au cours de nos études trouveront, grâce aux progrès expérimentaux actuels, des solutions dans la mesure où les données expérimentales deviennent de plus en plus précises et proches des données théoriques attendues. La divergence entre les distributions théoriques et les distributions expérimentales sur laquelle s'appuient nos calculs, s'atténue donc, laissant espérer une meilleure précision des résultats obtenus. Enfin, l'avantage d'utiliser la spectrométrie de masse réside aussi dans la possibilité d'exploiter non seulement le spectre de masse du composé parent enrichi, mais également les spectres de masse de ses fragments (enrichi aux mêmes taux, par uniformité des enrichissements), ce qui multiplie les données et permet d'accéder à la formule brute initiale avec plus d'assurance.

CHAPITRE III

METABOLISME DE LA ZEN *IN VITRO*

MISE EN EVIDENCE D'UN NOUVEAU METABOLITE

Jusqu'à présent, la plupart des études chez les mammifères portant sur le métabolisme de la ZEN concernaient les α/β -ZOLs, les α/β -ZALs, ou la ZAN. L'évocation de la formation d'un composé hydroxylé de la ZEN n'avait été alors faite que dans des extraits fongiques (El-Sharkawy and Abul-Hajj 1988) sans qu'il soit jamais retrouvé chez l'animal. Une étude récente a néanmoins révélé la formation d'un métabolite hydroxylé de la ZEN chez le rat (Pfeiffer *et al.*, 2007). Nous nous sommes intéressés dès 2005, pour notre part, à ce nouveau métabolite appelé OH-ZEN, dont nous avons déterminé la structure et mesuré l'activité oestrogénique.

I. Précisions expérimentales préliminaires

I-1. Conditions expérimentales d'incubations

Des solutions de formes exprimées de P450s humains ou des microsomes hépatiques humaines ou animales (concentration finale de 1 μ M en cytochrome P450) sont incubés avec un système générateur de NADPH (1 mM NADP + 10 mM Glucose-6-Phosphate, 1 UI¹ de G₆PDH), 100 μ M de MgCl₂ et 50 μ M de zéaralénone pendant 30 minutes à 37°C dans un tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,4). Des incubations contrôles sans microsomes ou sans système générateur de NADPH sont menées en parallèle.

Les réactions sont arrêtées par une addition du même volume d'acétonitrile froid, puis les tubes sont placés quelques minutes à -20°C. Après une centrifugation à 7500 g, les surnageants sont stockés à -20°C jusqu'à leur analyse.

Les incubations menées à pH 4,5 suivent le même protocole si ce n'est que le tampon utilisé est un tampon citrate à 0,1 M et que le système générateur de NADPH est remplacé par du NADPH à 50 μ M.

I-2. Chromatogrammes et aspects quantitatifs préliminaires

Toutes les grandeurs quantitatives qui seront présentées ci après, ont été déterminées à partir des chromatogrammes des métabolites formés au cours des incubations de ZEN avec les différentes formes exprimées considérées. Pour cela, nous nous sommes assurés que l'aire totale (substrat et métabolites) de la réponse UV (280 nm) était bien conservée au cours du métabolisme. Nous avons vérifié en spectrométrie de masse, grâce à des solutions étalons, que

¹ 1UI (Unités Internationales) = 1 mol d'équivalent réducteur produit par heure et par nmol de substrat.

le rendement d'ionisation de l' α - et β -ZOL et de l' α - et β -ZAL étaient comparables à celui de la ZEN. Nous avons, en outre vérifié que celui de l'OH-ZEN était également semblable en s'assurant que l'aire totale (ZEN + métabolites) était conservée dans des incubations présentant de l'OH-ZEN. Nous avons également validé les intensités spectrales mesurées par spectrométrie de masse avec des standards de ZEN, ZOLs et ZALs en s'assurant de la proportionnalité des signaux de masse et des signaux UV. Les coefficients d'extinction des métabolites de la ZEN (y compris l'OH-ZEN) ont été supposés voisins de celui de la ZEN dans la mesure où la partie aromatique responsable de l'absorption reste inchangée au cours du métabolisme.

Ceci nous a permis de calculer des taux de formation ou des activités en faisant le rapport des aires obtenues. L'aire des pics de ZEN et d'OH-ZEN est alors ramenée à une concentration grâce à une solution étalon de ZEN 100 μ M passée simultanément et dans les mêmes conditions. La Figure III.1 présente les signaux de la ZEN et de ces métabolites à partir desquels nous avons construit nos études quantitatives.

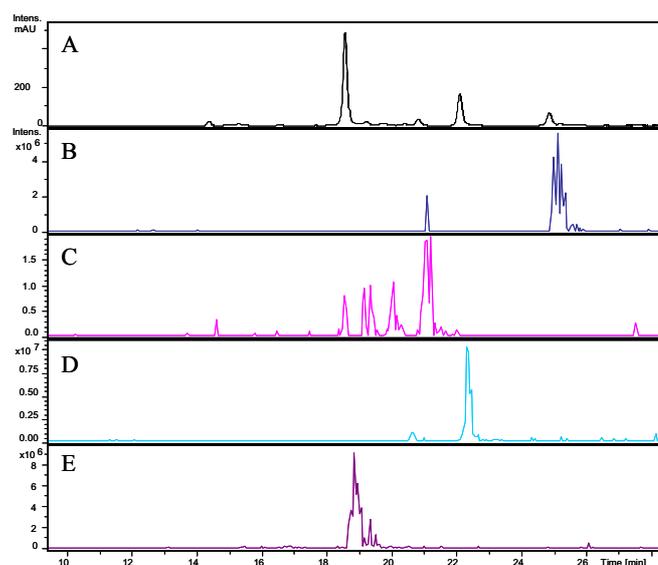


Figure III.1 : Chromatogrammes extraits des différents produits d'une incubation de ZEN avec 1 μ M de microsomes de rats PB après 30 minutes à pH 7,4.

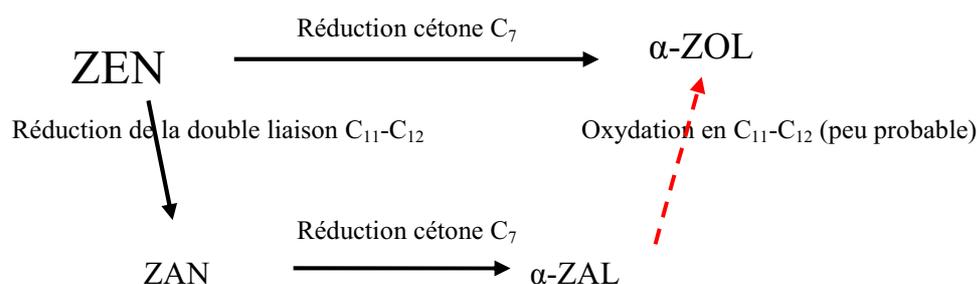
A : UV ; B : ZEN (m/z 317) ; C : OH-ZEN I (m/z 333) ; D : ZAN et ZOLs (m/z 319) ; E : OH-ZEN II (m/z 335). Les tracés sont réalisés à des échelles différentes par normalisation.

II. Activités des déshydrogénases mesurées à pH 4,5

Avant de nous intéresser spécifiquement au nouveau métabolite OH-ZEN de la ZEN, nous avons étudié quelques caractéristiques des produits de réduction de la ZEN par les déshydrogénases (HSD¹).

II-1. Conditions expérimentales de formation des ZOLs

L'objectif premier était ici de déterminer si, à pH 4,5, il y a formation de ZAN à partir de ZEN pour générer les autres métabolites (en particulier l' α -ZOL) ou s'il y a formation simultanée des deux métabolites ZAN et α -ZOL. Une étude cinétique des incubations a été menée pour répondre à cette question.



Pour cela des incubations à pH 4,5 (tampon citrate) sont préparées selon le protocole précisé précédemment, avec du NADPH (**50 μ M finale**), de la ZEN ou de la ZAN à **50 μ M finale**. Le volume total des incubations est de 1 mL de façon à pouvoir prélever 150 μ L toutes les 5 minutes pendant 30 minutes. Les microsomes utilisés sont les microsomes de rats traités au PB (**1 μ M finale**).

Le pourcentage de l'aire totale des pics obtenus est reporté en fonction du temps d'incubation pour la ZEN, la ZAN, l' α -ZOL, l' α -ZAL et le β -ZAL.

¹ Hydroxy Steroid Dehydrogenase

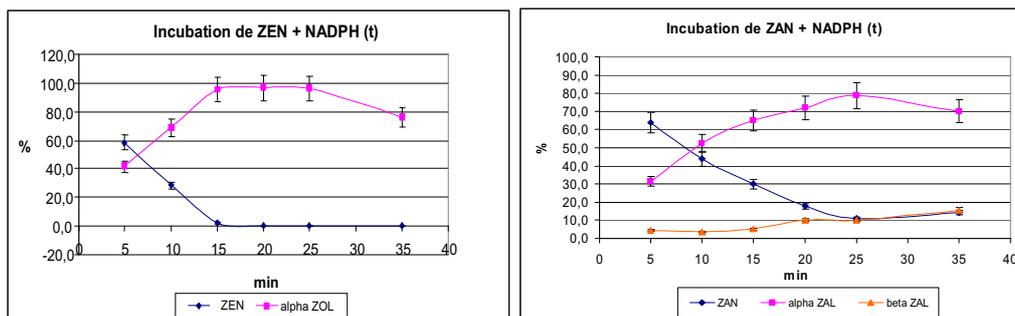


Figure III.2 : Taux de transformation de la ZEN (gauche) et de la ZAN (droite) et taux d'apparition de l' α -ZOL (gauche), de l' α -ZAL et du β -ZAL (droite) à pH 4,5 en présence de NADPH.

On constate que :

- la réduction de ZEN en α -ZOL et de ZAN en α -ZAL est NADPH dépendante ;
- conformément à la littérature, la ZEN est principalement transformée en α -ZOL à pH 4,5 (et ce, au bout de 15 minutes à 37°C) ;
- la ZAN est transformée à la fois en α et en β -ZAL à pH 4,5 ;
- la quantité d' α -ZOL diminue à partir de 25 minutes pour former un composé non retrouvé avec nos conditions expérimentales.

Enfin, l'oxydation de l' α -ZAL en α -ZOL n'a pas été observée.

II-2. Inhibiteurs des HSDs

Avant de tester des inhibiteurs spécifiques des déshydrogénases 3α et 3β HSD responsables de la formation respective de l' α -ZOL et du β -ZOL (Malekinejad *et al.*, 2005), nous avons réalisé des incubations classiques avec des microsomes de rats PB, de la ZEN à 50 μ M, à pH 4,5 mais en remplaçant le NADPH utilisé habituellement, par du NADH avec lequel la formation de ces deux derniers métabolites n'est pas observée à ce pH.

Comme attendu, nous n'avons constaté aucune formation de métabolite, ni α - ni β -ZOL (encore moins l' α -OH-ZEN qui, nous le verrons plus loin, est formé préférentiellement à pH 7,4).

Pour aller plus loin, nous avons testé des inhibiteurs spécifiques des 3α et 3β déshydrogénases : l'indométhacine qui est un inhibiteur des 3α HSDs (Takikawa *et al.*, 1987; Pirog et Collins, 1994) et la prégnénolone qui est un substrat de la 3β HSD (Tsubota *et al.*, 1993; Malekinejad *et al.*, 2006). La présence de ces deux composés, si elle perturbe la formation des α et β -ZOL confirmerait l'implication des déshydrogénases dans la formation de ces deux derniers métabolites de la ZEN.

Pour cela nous reprenons le protocole d'incubations à pH 4,5 avec des microsomes de rats PB en rajoutant 20 μ M d'indométhacine ou de prégnénolone. Là encore les incubations sont analysées par HPLC-UV. Contrairement à nos attentes, la formation de l' α - et du β -ZOL n'est pas altérée ni par l'ajout d'indométhacine, ni par celui de prégnénolone. La même expérience a été réalisée avec succès par Sylvaine Lecoer¹ sur cellules Caco2². Ceci nous laisse penser que les isoformes présentes dans les microsomes de foie de rats PB ne sont pas les mêmes que celles présentes dans les cellules Caco2. En effet, puisque ces HSDs montrent des expressions différentes selon les tissus, l'utilisation d'inhibiteurs de ces enzymes va induire des réponses différentes selon les tissus (Penning, 2003). Notons cependant que l'activité HSD n'a pas été vérifiée sur microsomes en utilisant un stéroïde.

II-3. Conclusions

Nos avons vérifié la formation de l' α -ZOL à partir de ZEN à pH 4,5 en présence de microsomes de rats PB. Par ailleurs, rappelons que la réduction de la ZEN dans la cellule est réversible : chacun des métabolites réduits étant capable de générer la ZEN. En effet, les HSDs sont capables d'une activité soit réductase soit déshydrogénase, l'une ou l'autre activité étant prépondérante en fonction de l'isoforme présente et de la disponibilité en cofacteurs (Askonas *et al.*, 1991; Penning *et al.*, 1996; Penning, 2003; Persson *et al.*, 2003). Ceci peut également représenter une source de difficultés pour mesurer l'effet des inhibiteurs HSDs que nous avons testés (prégnénolone et indométhacine).

La caractérisation des isoformes HSD présentes dans les microsomes de rats PB reste cependant à réaliser. En effet, chez l'homme, quatre isoformes α -HSD ont été répertoriées comme jouant un rôle important dans la biosynthèse des acides biliaires dans le foie ainsi que dans l'élimination hépatique des hormones stéroïdes (Penning *et al.*, 1997).

Enfin, rappelons que d'autres systèmes enzymatiques sont capables de réduire des cétones en alcools, par exemple des alcools déshydrogénases, qui pourraient être présents dans les microsomes de rats et participer à la formation des ZOLs.

¹ De l'École Nationale Vétérinaire de Lyon (INRA)

² Lignée cellulaire d'un adénocarcinome colorectal humain

III. Activités mono-oxygénasiques des P450s mesurées à pH 7,4

III-1. Formation d'un nouveau métabolite OH-ZEN

Parmi les produits formés dans des incubations de ZEN avec des microsomes de rats traités au phénobarbital (notés microsomes de rats PB), nous avons observé un nouveau métabolite ayant un temps de rétention différent de celui de l' α -ZOL ou du β -ZOL, également formés à pH 7,4. Ce composé, appelé OH-ZEN, a, en spectrométrie de masse ESI en mode négatif, un m/z de 332,8, correspondant à un métabolite mono-hydroxylé de la ZEN (M+16). Ce métabolite est formé en grande quantité avec des microsomes de rats PB (environ 5 nmol /nmol P450/30 min), Figure III.3.

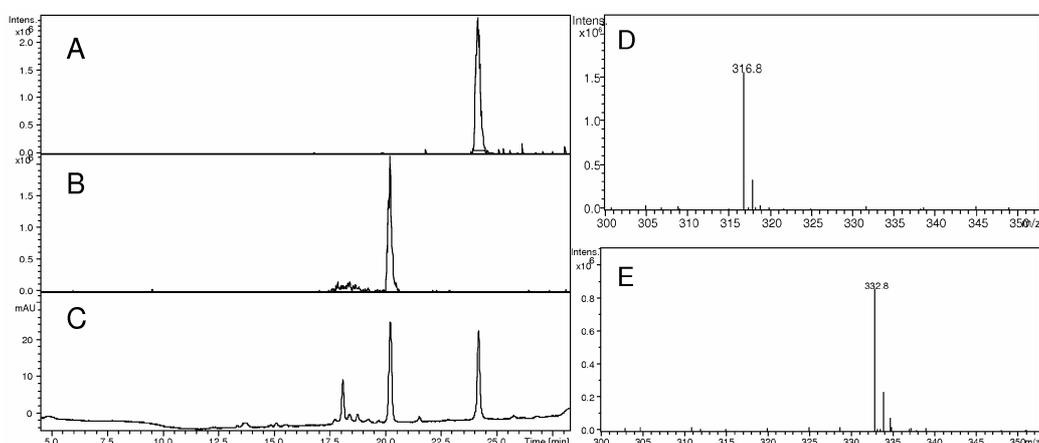


Figure III.3 : Chromatogrammes HPLC-UV et spectres de masse HPLC-MS de la ZEN et de l'OH-ZEN formé au bout de 30 minutes d'incubation *in vitro* (1 μ M en cytochromes P450 des microsomes de rats PB en présence de 50 μ M de ZEN et de 1 mM de système générateur de NADPH dans du tampon phosphate à pH 7,4).

(A) Chromatogrammes HPLC-MS extraits des ions m/z 316,8 (ZEN) et (B) m/z 332,8 (OH-ZEN) ; (C) HPLC-UV à 280 nm; (D) Spectre MS du pic à 23,5 min correspondant à la ZEN et (E) du pic à 20 min correspondant à l'OH-ZEN.

Afin d'étudier la distribution et les occurrences de l'OH-ZEN parmi les différentes espèces de mammifères, nous avons fait des incubations avec des préparations microsomales hépatiques autres que celles de rats PB en suivant le même protocole.

Presque toutes les espèces testées, l'homme inclus, produisent ce nouveau métabolite OH-ZEN avec des proportions différentes d' α -ZOL, de β -ZOL et d'OH-ZEN. La formation la plus significative d'OH-ZEN a été obtenue avec des microsomes de chien et de singe (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Métabolisme *in vitro* de la zéaralénone avec des microsomes humains et des microsomes de différentes espèces animales (mammifères).

	α-ZOL	β-ZOL	OH-ZEN
Souris	41,3±11,5	n.d.	n.d.
Rat	14,7±2,5	n.d.	1,7±0,7
Rat PB	n.d.	3,3±0,4	4,9±0,3
Lapin	2,5±0,4	1,9±0,4	2,2±0,2
Chien	2,8±0,3	n.d.	8,1±0,5
Porc	7,4±0,6	10,0±1,8	n.d.
Cyno LM	4,0±0,4	n.d.	8,4±4,0
Humain Femme	3,3±0,5	0,3±0,1	0,4±0,1
Humain Homme	3,6±0,3	n.d.	traces
Humain ¹	5,3±0,9	2,6±0,3	1,4±0,4

Les taux de conversion de la ZEN et les taux de formation de ses métabolites α -, β -ZOL et OH-ZEN ont été mesurés après 30 min d'incubations en utilisant 1 μ M de cytochrome P450s, 50 μ M de ZEN et 1 mM de système générateur de NADPH dans du tampon phosphate à pH 7,4. Les résultats sont exprimés en nmol /nmol P450 /30 min d'après les signaux d'absorption UV à 280 nm. (n=4, « n.d. » signifie non détecté et « traces » signifie détectés mais en dessous du seuil de quantification).

Dans des conditions d'incubations identiques, les microsomes de rats PB sont au moins 10 fois plus actifs que les microsomes de femmes. Les microsomes d'hommes n'ont permis de former aucune quantité détectable d'OH-ZEN. La différence entre la quantité d'OH-ZEN formée à partir d'un lot de microsomes humains (hommes et femmes mélangés), et à partir de microsomes exclusivement d'hommes ou exclusivement de femmes, provient sans doute de la nature du lot utilisé qui devait contenir plus de microsomes de femmes que d'hommes.

Par ailleurs, d'autres composés non identifiés ont pu être formés au cours de ces incubations, mais nous ne nous sommes intéressés durant ce travail qu'à la formation de l'OH-ZEN et des métabolites α - et β -ZOL.

III-2. Conditions optimales de formation de l'OH-ZEN

Les incubations à partir des différents extraits microsomaux précédents ayant permis de former ce nouveau métabolite OH-ZEN, nous avons alors cherché à préciser et à optimiser les paramètres pouvant influencer cette réaction enzymatique. Les conditions expérimentales (type de microsomes, pH, concentration en protéines, concentration en ZEN, système générateur, etc.) ont été modifiées une à une afin d'obtenir des quantités suffisantes d'OH-ZEN nécessaires à sa résolution structurale.

¹ Le lot de microsomes humains utilisés ici était composé de microsomes d'hommes et de femmes.

III-2.1. Influence des microsomes

Un doctorant du laboratoire, Radu Duca, en charge de l'étude *in vivo* du métabolisme de la ZEN, a traité une série de rats avec différents inducteurs de P450s connus, durant trois jours. Il a ensuite prélevé le foie de ces rats et préparé des fractions subcellulaires (microsomes) par des centrifugations et des extractions successives. Suivant le produit injecté durant le traitement des animaux, seules certaines formes de P450s ont été induites : les microsomes préparés sont donc plus ou moins riches en certaines formes de P450s. Les concentrations totales en protéines et en P450s ont été mesurées (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Concentration de P450s et des protéines totales dans les différents extraits de foie de rats traités.

Traitements	Conc P450 μM (nmol/mL)	Prot. Conc mg/mL	nmol P450 / mg Prot
Contrôle	12	8,96	1,34
Huile	4	2,78	1,44
Phenobarbital	28	13,50	2,07
Dexamethasone	15	5,86	2,56
β -Naphthoflavone	18	9,64	1,87
Clofibrate	17	11,17	1,52
Zéaralenone	16	11,67	1,37
Zéaralenone PO	21	17,62	1,19

Injections intra péritonéale (*i.p.*) de 1 mL/jour/rat pour le contrôle et 0,5 mL/jour/rat pour l'huile et les autres produits (en solution dans l'huile). Cf travaux de Radu Duca pour les traitements détaillés.

L'étude du métabolisme oxydant a été faite par la réalisation d'incubations de ZEN ^{12}C à 50 μM en présence d'un équivalent de 1 μM en P450s des différents microsomes, à pH 7,4 et à pH 4,5. Les conditions d'incubations utilisées sont identiques au protocole indiqué au début de ce chapitre.

Le calcul des pourcentages de la répartition des différents métabolites formés a été fait à partir des analyses LC-MS (absorption à 280 nm) de chacune des incubations avec les divers microsomes.

Afin d'identifier les métabolites formés, il convient de vérifier le temps de rétention des composés de référence dans les deux tampons à pH 4,5 et à pH 7,4. Pour cela, les solutions à 10^{-2} M dans le DMSO sont diluées 100 fois dans les deux tampons jusqu'à une concentration de 10^{-4} M (Tableau III.3).

Tableau III.3 : Temps de rétention et masse molaire de la ZEN et de ses métabolites sur HPLC.

Composé	Masse molaire	Temps de rétention à pH 4,5 (min)	Temps de rétention à pH 7,4 (min)
ZEN	318	22,43	22,48
α -ZOL	320	19,94	19,94
β -ZOL	320	18,46	18,45
ZAN	320	22,26	22,28
α -ZAL	322	19,64	19,64
β -ZAL	322	18,22	18,20
OH-ZEN(I) : M+16	334		~19
OH-ZEN(II) : M+18	336		~17

La détection UV est faite à 280 nm. Les conditions HPLC sont détaillées au chapitre VI.

L'analyse des masses des métabolites formés avec les microsomes de rats PB a révélé la présence de plusieurs (au moins 4) pics répondant en mode négatif à m/z 333 (M+16) : les deux pics majoritaires répondant à cette masse (et ayant des temps de rétention plus importants que les autres) ont été notés ici OH-ZEN I (1) et OH-ZEN I (2), éluant respectivement à 21,2 et 20,5 minutes (Figure III.4, les temps de rétention étant différents, les deux composés doivent avoir une structure différente). De même, deux composés répondant en mode négatif à m/z 335 (M+18), sont présents sur le chromatogramme. Ces deux composés ont été notés OH-ZEN II¹ (1) et OH-ZEN II (2) éluant respectivement à 19,2 et 18,2 minutes (Figure III.4).

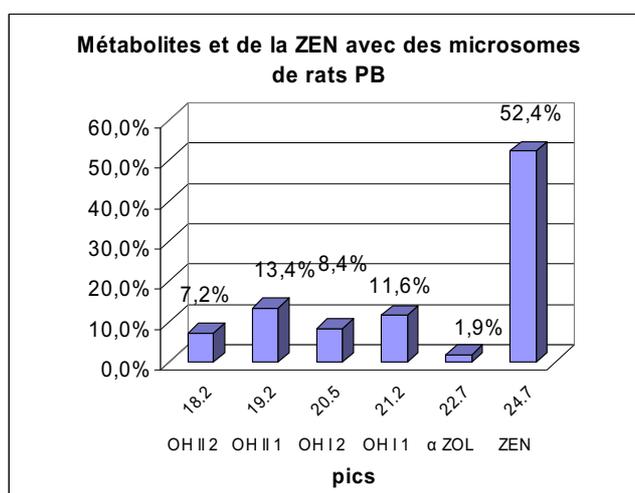


Figure III.4 : Répartition des différents métabolites des incubations PB à pH 7,4.

Les pourcentages indiqués sont calculés à partir de l'aire totale des 6 composés relevés. Ils représentent donc la répartition de chacun d'eux dans une incubation de ZEN à 50 μ M avec 1 μ M de microsomes de rats PB au bout de 30 minutes à pH 7,4.

¹ Remarque : Cette appellation « OH-ZEN » pour des composés de rapport m/z 335 est un peu abusive dans la mesure où il s'agit d'un dérivé hydroxylé ET hydraté de la ZEN. Néanmoins, puisqu'ils ne font pas l'objet d'étude principal de ce travail, nous avons conservé cette dénomination.

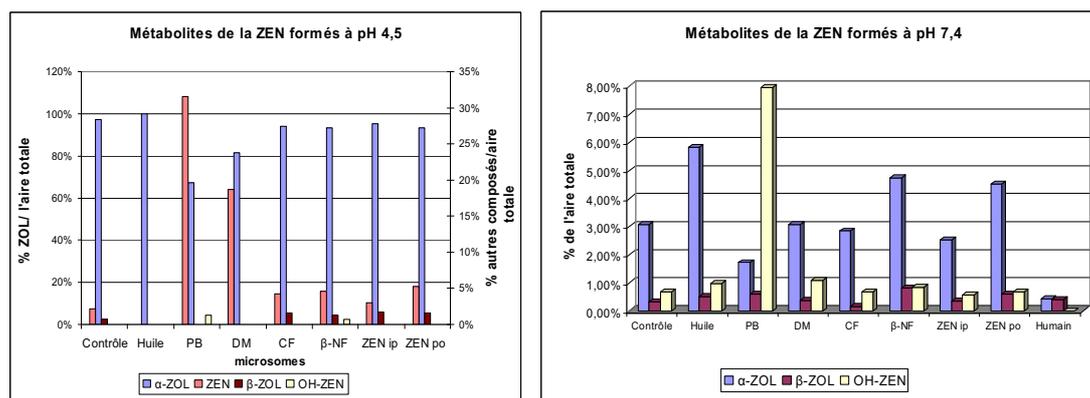


Figure III.5 : Répartition de la ZEN, des α/β -ZOL et de l'OH-ZEN I (1) dans les incubations réalisées avec les microsomes de rats traités par différents inducteurs de P450s, à pH 4,5 (gauche) et à pH 7,4 (droite).

Les lettres indiquées sur l'axe des abscisses font référence aux traitements injectés aux rats : PB = phénobarbital ; DM = dexaméthasone ; CF = clofibrate ; β -NF = β -naphtoflavone ; ZEA IP = ZEN *intra* péritonéale ; ZEA PO = ZEN *per os*. Cf Tableau III.2 pour les concentrations en protéines et en P450s.

- Dans un premier temps il apparaît que :
 - la formation des différents métabolites est NADPH dépendante ;
 - l' α -ZOL se forme préférentiellement à pH acide (4,5) et moins à pH neutre (7,4) alors que le β -ZOL se forme préférentiellement à pH 7,4 ;
 - l'OH-ZEN se forme peu à pH 4,5 comparativement à la quantité produite à pH 7,4.
- Dans un second temps, plusieurs composés correspondant à des métabolites « hydroxy » sont formés dans ces conditions : OH-ZEN I (1) et (2) de masse molaire 334 (M+16) ayant un temps de rétention de l'ordre de 21 et 20,5 minutes avec les conditions d'analyse LC-MS précisées au chapitre VI et OH-ZEN II (1) et (2) de masse 336 (M+18) et éluant autour de 19,2 et 18,5 minutes. Ces derniers correspondent globalement à une hydratation de la ZEN (M+18). Ils peuvent provenir soit de l'oxydation des α - ou β -ZOL, soit d'une réduction de l'OH-ZEN I.
- Il semble que les microsomes de rats PB produisent une quantité plus importante de métabolite « hydroxy » (toutes formes confondues). C'est pourquoi, ces microsomes seront choisis par la suite pour la formation de « l'hydroxy » à partir de la ZEN ^{13}C ou de la ZEN naturelle.

Désormais pour les études structurales et la suite de l'étude, nous ne retiendrons que l'OH-ZEN I (1), le plus abondant, que l'on nommera **OH-ZEN** par la suite. Les **microsomes de rats PB** ont été retenus pour les conditions optimales de formation de ce dernier.

III-2.2. Effet du pH

D'après ce qui précède, nous avons vu que la quantité d'OH-ZEN formée par les microsomes de rats PB dépend du pH : OH-ZEN est formé à pH 7,4 mais pas à pH 4,5. Afin d'optimiser nos conditions expérimentales, nous avons fait une étude plus fine en faisant varier le pH. Pour cela, nous avons utilisé des solutions tampon couvrant une gamme de pH de 4,5 à 8 (tampons citrate ou phosphate). Enfin, nous avons utilisé du NADPH (50 μ M) et non un système générateur de NADPH dont l'activité enzymatique de la G₆PDH peut varier en fonction du pH

Ces incubations nous ont d'abord permis de confirmer que l' α -ZOL se forme préférentiellement à pH 4,5, puis de constater que l'OH-ZEN ne se forme que dans une fenêtre de pH très précise : entre 6,5 et 7,5 :

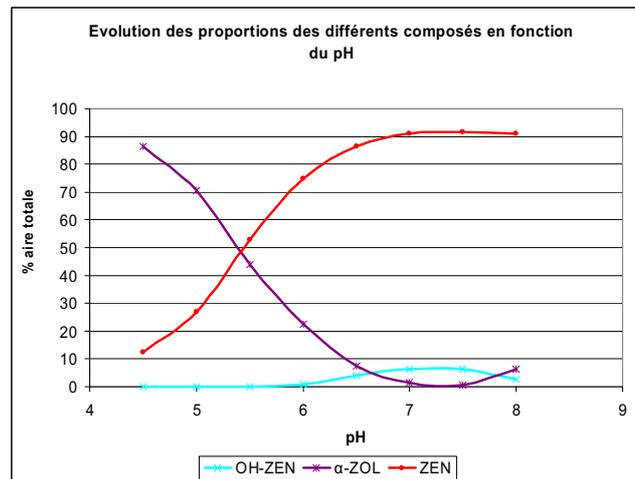


Figure III.6 Formation de différents métabolites de la ZEN en fonction du pH au bout de 30 minutes d'incubation avec des microsomes de rats PB.

Le pH optimal retenu pour la formation de l'OH-ZEN est dans la zone 7-8 et nous avons choisi pour la suite de l'étude le **pH = 7,4**.

III-2.3. Effets de la concentration en protéines microsomales

Lors des expériences précédentes, la concentration de référence choisie était celle des P450s et était constante égale à 1 μ M. Par conséquent la concentration finale en protéines étaient alors de 0,5 mg/mL pour les microsomes de rats traités par du phénobarbital. Afin de choisir la concentration adaptée à la formation de l'OH-ZEN, nous avons procédé à une série

d'incubations suivant le même protocole mais en faisant varier les concentrations en protéines des microsomes de rats PB de **0,1 à 2 mg de protéines/mL**.

Conformément aux résultats précédents, nous nous sommes placés à pH 7,4, avec 50 μ M de ZEN et des **microsomes de rats PB**.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'aire totale des signaux UV (absorption à 280 nm) mesurés par HPLC-UV.

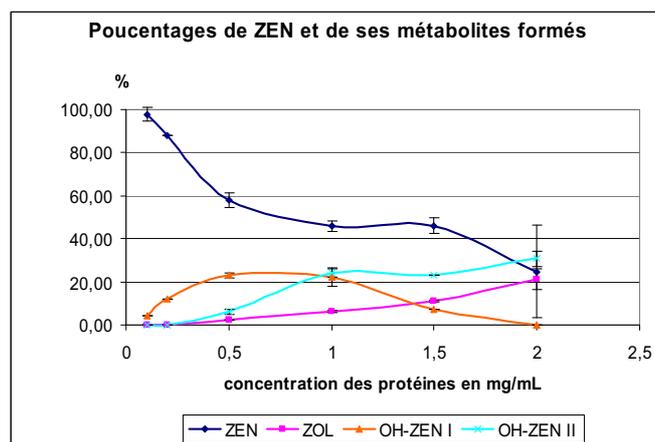


Figure III.7 : Taux de conversion de la ZEN et taux d'apparition de ses principaux métabolites à pH 7,4 en fonction de la concentration des protéines microsomaux.

On observe la formation de l'hydroxy OH-ZEN I (1) mais aussi celle de l'hydroxy OH-ZEN II (1) qui ont été mis en évidence lors de l'étude avec les différents types de microsomes au paragraphe précédent (III-2.1). De plus, la formation de l'un correspondant à la disparition de l'autre, nous avons pensé à une relation précurseur-dérivé entre ces deux composés. L'OH-ZEN II pourrait être un produit de réduction ultérieure de l'OH-ZEN I.

Les analyses montrent par ailleurs que le nombre de métabolites formés est plus important en augmentant la concentration c en protéines :

- si $c < 0,5$ mg/mL, seul OH-ZEN I est formé en quantités appréciables (jusqu'à 20% de la ZEN initiale) ;
- si $0,5 < c < 1$ mg/mL, OH-ZEN I est dominant mais OH-ZEN II apparaît jusqu'à atteindre 20% du métabolisme de la ZEN et le β -ZOL atteint, à 1 mg/mL, 5% du métabolisme;
- si $c > 1$ mg/mL, l'OH-ZEN II devient le métabolite prédominant devant l'OH-ZEN I dont le taux de formation décroît, mais aussi devant le β -ZOL qui atteint 22% du métabolisme de la ZEN.

Ainsi, plus la concentration en protéines microsomales est élevée, plus l'activité métabolique est importante : le taux de disparition de la ZEN augmente avec la concentration en protéines. Aussi, puisque la deuxième forme de l'hydroxy ZEN (OH ZEN II) apparaît en quantité significative au-delà de 0,5 mg de protéines/ mL, et que celle de OH ZEN I baisse au-delà de 1 mg de protéines/ mL, il semble avantageux de ne pas choisir une concentration en protéines trop élevée. Pour cela, nous choisissons une concentration maximale de **0,5 mg protéines/mL**, soit une concentration totale en **P450s de 1 μ M**, afin d'obtenir majoritairement l'OH ZEN I et de limiter la formation des autres métabolites.

Après les variables physico-chimiques, nous nous sommes intéressés aux paramètres enzymatiques de la réaction de formation de l'OH-ZEN et avons essayé de les optimiser afin d'améliorer la vitesse de cette réaction.

III-2.4. Influence de la concentration en ZEN

Nous avons utilisé jusqu'à présent une concentration finale en ZEN de 50 μ M. Il s'agit ici de vérifier que cette concentration est adaptée à la formation de l'OH-ZEN. Pour cela nous nous plaçons dans les conditions standard d'incubation avec les paramètres optimaux déterminés jusque là (pH 7,4 ; concentration en P450s des microsomes de rats PB de 1 μ M).

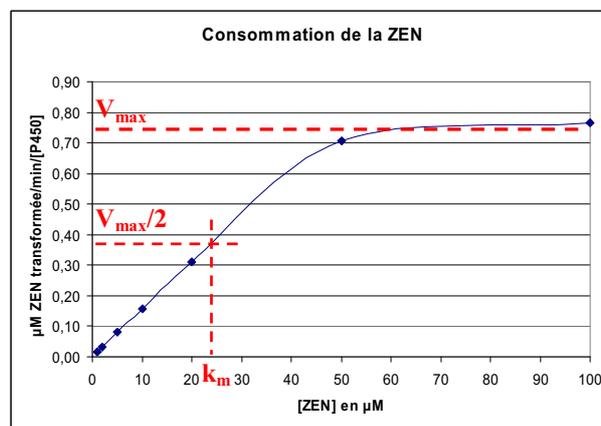


Figure III.8 : Quantité de métabolites totaux formés par unité de temps et par mole de P450 en fonction de la concentration de ZEN.

La valeur du K_M est déterminée à $V_{max}/2$ et représente donc la concentration en ZEN pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale.

On trouve un K_M^1 de $23 \pm 1 \mu$ M et une V_{max} de $0,75 \pm 0,02$ nmol/min/nmol de P450. Il ne s'agit que d'une approximation puisque nous avons considéré ici l'ensemble des métabolites

¹ K_m reflète l'affinité de l'enzyme (protéine responsable du métabolisme de la ZEN) pour son substrat (la ZEN).

formés alors qu'il faudrait théoriquement calculer un K_M pour chaque métabolite. Cette grandeur représente la concentration en ZEN pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est à la moitié de la vitesse initiale maximale. C'est pourquoi nous retenons une concentration de **ZEN de 50 μM** ($\sim 2 K_M$).

III-2.5. Influence du système générateur

Le dernier paramètre qui pourrait influencer la quantité d'OH-ZEN formée et sa vitesse de formation est la nature du système générateur. Si jusque là nous utilisons du NADPH à pH 4,5 et un système générateur de NADPH à pH 7,4 (pH optimal précédemment déterminé), nous avons préféré tester l'efficacité du NADPH à pH 7,4. Par ailleurs, l'EDTA, qui est un inhibiteur de protéases et un chélatant des métaux libres, pourrait limiter la formation d' α - et β -ZOL. C'est pourquoi nous avons étudié son influence sur la formation de l'OH-ZEN.

En suivant le protocole classique et en retenant les conditions optimales pour la formation de l'OH-ZEN déterminées jusque là, nous avons calculé le taux de formation de l'OH-ZEN en utilisant du NADPH ou du système générateur avec ou sans EDTA.

Tout d'abord, à la seule considération des chromatogrammes, les pics des α/β -ZOL ne disparaissent pas dans les incubations avec de l'EDTA, ce qui nous laisse penser que la présence d'EDTA ne modifie pas fondamentalement le métabolisme de la ZEN en α/β -ZOL.

Le taux de conversion de la ZEN en OH-ZEN avec du système générateur en présence d'EDTA est de **12%** environ. Alors que sans EDTA, le taux de conversion de la ZEN en OH-ZEN est de **20%** environ. En revanche, il apparaît clairement que les incubations en présence de système générateur sont plus efficaces que celles en présence de NADPH : le taux de conversion de la ZEN en OH-ZEN en présence de NADPH est d'environ **16%** alors qu'en présence de système générateur il est d'environ **20%**.

- Le tampon contenant de l'EDTA ne sera pas utilisé pour la production d'hydroxy ZEN.
- A pH 7,4 le **système générateur de NADPH** sera préféré au NADPH qui sera utilisé à pH 4,5.

III-2.6. Bilan et conclusions

D'après les résultats des expériences précédentes, les conditions d'incubations optimales pour la formation du métabolite OH-ZEN retenues sont :

- ZEN ¹²C à **50 µM** ;
- **Microsomes de rat PB à 0,5 mg prot/mL, soit 1 µM en P450s** ;
- **Système générateur** de NADPH (SG + G₆PDH + MgCl₂);
- Tampon phosphate **pH 7,4** ;

Une fois ces conditions expérimentales déterminées, nous nous sommes intéressés de plus près aux enzymes responsables de la formation de ce nouveau métabolite OH-ZEN. Puisque sa formation était variable selon les microsomes de rats utilisés, nous en avons déduit que certaines isoformes de cytochromes P450s étaient impliquées dans sa formation. Les traitements effectués sur des rats étant composés d'inducteurs plus ou moins spécifiques de certains P450s, nous pouvons avancer l'hypothèse que les formes responsables du métabolisme de la ZEN sont les formes 1, 2 ou 3 qui sont induites par le phénobarbital (de Montellano, 1986). Une manière de confirmer ces hypothèses est d'étudier le métabolisme de la ZEN sur microsomes présentant des formes exprimées de P450s humains (lignée cellulaire de cellules d'insecte qui expriment le gène d'intérêt). Il convient également de vérifier que les microsomes humains (nous avons travaillé jusqu'à présent sur des microsomes de rats), métabolisent eux aussi la ZEN, dans les mêmes conditions expérimentales.

III-3. Métabolisme de la ZEN par des formes exprimées de cytochromes P450s

III-3.1. Microsomes humains

Avant de déterminer quelle(s) isoforme(s) sont responsables de la formation de l'OH-ZEN dans nos conditions d'incubation, nous avons testé l'activité des microsomes humains (1 µM) sur la ZEN (50 µM) à pH 7,4 au bout de 60 minutes.

Dans la mesure où la ZEN appartient à la famille des perturbateurs endocriniens, avons distingué les microsomes humains provenant d'hommes ou de femmes.

Tableau III.4 : Concentrations initiales des microsomes humains utilisés pour les incubations de ZEN.

P450	[P450s] nmol/mL (μ M)	[protéines] mg/mL
microsomes femmes (Xenotech)	8	20
microsomes hommes (Xenotech)	6.5	21.7

Les incubations sont analysées par couplage LC (absorption UV à 280 nm) -MS car le taux de métabolisme de la ZEN par les microsomes humains n'est pas suffisant pour exploiter les signaux UV seuls : les pics des quelques métabolites obtenus sont trop faibles pour se passer d'une confirmation de la masse des composés formés.

Si les microsomes de femmes métabolisent un peu la ZEN en OH-ZEN (éluant autour de 20 minutes et répondant à m/z 333), les microsomes d'hommes ne métabolisent pas du tout la ZEN en OH-ZEN. En revanche, on constate que les deux types de microsomes métabolisent la ZEN en α et β -ZOL, conformément à la littérature (Gaumy *et al.*, 2001).

Les microsomes d'hommes et de femmes diffèrent par leurs taux des différentes isoformes de P450 (Tableau III 5) ; les différences portent essentiellement sur les formes 2C8, 2B6 et 3A4.

Tableau III 5 : Concentration en P450s et protéines totales des formes 1, 2 et 3 humaines utilisées pour les incubations de ZEN.

P450s	Activité enzymatique sur un substrat spécifique (pmol/mg protéine /min)	
	Hommes	Femmes
2D6	286 \pm 8	270 \pm 11
2C19	69 \pm 4	77 \pm 2
2E1	1810 \pm 20	1040 \pm 0
2A6	904 \pm 20	914 \pm 28
2C8	203 \pm 5	357 \pm 12
2C9	1330 \pm 30	1310 \pm 20
2B6	82 \pm 2	65 \pm 2
2C18	/	/
3A4	2790 \pm 70	3260 \pm 80
3A5		
1A1	/	/
1A2	44 \pm 2	35 \pm 2

Les compositions des microsomes humains (hommes et femmes) pour les différentes formes exprimées étudiées ont été rappelées. Ces activités sont mesurées avec des substrats connus de ces formes ($n \geq 3$).

III-3.2. Formes exprimées humaines

Dans la mesure où les incubations de ZEN avec des microsomes de rats PB conduisent à la formation d'OH-ZEN, nous avons réalisé des incubations de 50 μ M ZEN avec 1 μ M de différentes isoformes des P450s humaines induites par le traitement aux barbituriques : les formes 1 (CYP1A1, 1A2), les formes 2 (2D6, 2C19, 2E1, 2A6, 2C8, 2C9, 2B6, 2C18) et les formes 3 (3A4 et 3A5). Le temps d'incubation a été de 60 minutes afin d'obtenir des quantités suffisantes de métabolite. Néanmoins il convient de préciser que la réaction de formation de l'OH-ZEN, catalysée par les microsomes de rats PB comme par les formes exprimées n'est pas linéaire. Les microsomes de rats PB étant plus efficaces, 30 minutes suffisent pour obtenir une quantité détectable d'OH-ZEN.

Les cytochromes de la famille 2 nous ont été fournis par la société Tebu-bio. Il s'agit de cytochromes humains Cypex et de CYP-réductases humaines exprimés chez *Escherichia coli*. Le tampon de culture du micro-organisme était un tampon Tris-acétate à 50 mM, avec 250 μ M de sucrose et 0,25 mM d'EDTA (pH 7,6).

Les incubations de ZEN à 50 μ M en présence des différents CYPs à 1 μ M sont pratiquées dans les conditions expérimentales présentées au paragraphe précédent.

Tableau III 6 : Concentrations en P450s et protéines totales des formes exprimées des familles 1, 2 et 3 humaines utilisées pour les incubations de ZEN.

P450s	Formes exprimées humaines		Métabolite obtenu après 60 min d'incubation de ZEN
	[P450] nmol/mL	[protéines] mg/mL	OH-ZEN I* pmol/nmolP450/min
2D6	3,8	26,8	Traces
2C19	4,7	15	Traces
2E1	5,5	16,2	Traces
2A6	3	10,1	Traces
2C8	9,1	6	46 ± 4
2C9	2,1	16,3	Traces
2B6	3,3	12,2	Traces
2C18	5,9	8,6	Traces
3A4	3,9	14,8	3,7 ± 0,3
3A5	1,4	11,7	Traces
1A1	4,2	23,5	n.d.
1A2	1	6	n.d.

Le turnover de l'OH-ZEN a été calculé à partir de l'intégration du pic d'OH-ZEN obtenu après 60 minutes d'incubation de ZEN à pH 7,4. L'utilisation d'un standard externe de ZEN a permis de calculer la quantité de métabolite formé (n=4). « Traces » signifie détectable mais non quantifiable.

*seule la forme I de l'OH-ZEN (m/z 333) a été retrouvée dans les incubations avec les différentes formes de P450s. Nous n'avons pas retrouvé d'OH-ZEN II (m/z 335).

Les chromatogrammes UV (absorption à 280 nm) montrent une activité enzymatique : le 2C8 semble favoriser la formation d'un métabolite qui élué autour de 18,8 min et que l'on peut associer au pic de l'hydroxy OH-ZEN. Le taux de conversion de ce métabolite est d'environ 1% (par rapport à la ZEN initialement présente), soit un turnover d'environ 40 pmol/nmolP450/min. Il est déterminé par intégration du pic d'OH-ZEN et de celui d'un standard externe de ZEN qui nous permet de calculer la quantité d'OH-ZEN formée.

L'analyse de ce pic par spectrométrie de masse confirme cette dernière hypothèse : la masse de ce pic répond à m/z 332,8 en mode négatif.

L'analyse des spectres de masse démontre la présence d'un composé de masse m/z 333 pour toutes les formes 2 (entre 0,2 et 0,3% de métabolisme par rapport à la ZEN initialement présente), mais les formes **2B6**, **2C8** et **2C19** métabolisent cet hydroxy plus que les autres formes (~1%).

Afin de confirmer le métabolisme de la ZEN par les formes 2C8, nous avons réalisé des incubations en présence de CYP 2C8 ou de 1 μ M de microsomes de rats PB, de 50 μ M ZEN, substrat de ces formes d'après les précédents résultats, et d'un substrat des formes 2C8 : le paclitaxel® (appellation commerciale du taxol) à 20 μ M. Il s'agissait ici d'une réaction d'inhibition compétitive entre deux substrats du CYP 2C8.

La comparaison des métabolites formés avec chacun des microsomes étudiés, a permis de mesurer l'effet du Paclitaxel et d'estimer l'implication les formes 2C8 dans le métabolisme de la ZEN.

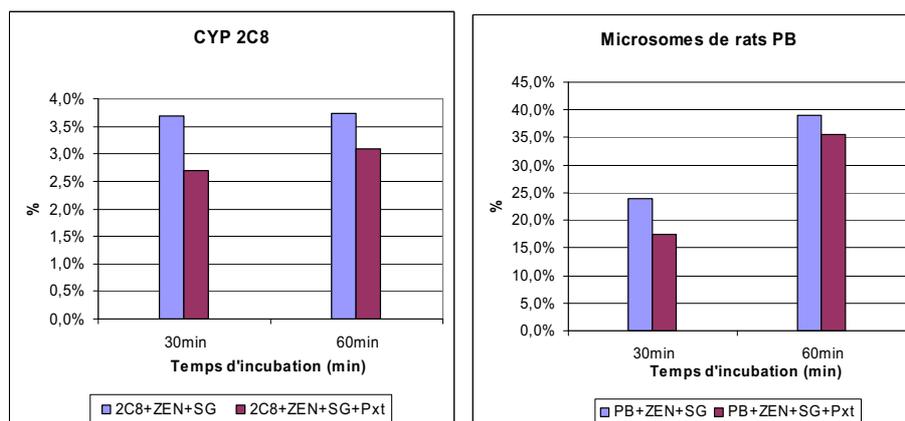


Figure III.9 : Rapports des aires des pics OH-ZEN et ZEN dans les incubations en présence de 2C8 ou de microsomes de rats PB en fonction du temps et des conditions d'incubation (Pxt : Paclitaxel ; SG : système générateur).

Les pourcentages de l'aire de l'OH-ZEN par rapport à la quantité de ZEN initialement introduite ont été reportés en fonction du temps d'incubation pour les 2 types de microsomes. Les diagrammes bleus correspondent aux incubations sans paclitaxel et les diagrammes rouge bordeaux correspondent aux incubations avec paclitaxel (n=2).

Plusieurs résultats apparaissent après étude des chromatogrammes obtenus :

- tout d'abord, nous pouvons constater que l'ajout de Paclitaxel diminue le métabolisme de l'OH-ZEN dans les incubations en présence de 2C8 et de microsomes de rats PB. Vue la faible diminution (1% et 5% pour CYP 2C8 et 6% et 4% pour les microsomes de rats PB à 30 et 60 minutes respectivement), elle pourrait aussi être attribuée à l'imprécision des mesures. Néanmoins il semble y avoir une tendance à la diminution du métabolisme en présence de Paclitaxel ;
- les microsomes de rats PB sont plus efficaces que les formes 2C8 pour catalyser la formation de l'OH-ZEN (25% contre 3,5%) ;
- au bout de 30 minutes la formation de l'OH-ZEN n'évolue plus avec les formes 2C8.

Dans la mesure où le Paclitaxel influe sur la formation de l'OH-ZEN, nous en déduisons que les formes 2C8 sont impliquées dans sa formation.

Les formes 3A4 et 3A5 semblent quant à elles métaboliser partiellement la ZEN en OH-ZEN : les chromatogrammes UV révèlent un pic voisin de celui de l'OH-ZEN (vers 18,7 min vs 18,4 pour l'OH-ZEN). Analysés par couplage HPLC-MS, un pic large apparaît répondant à la masse de m/z 333, non présent dans les incubations sans système générateur.

Afin de vérifier quelle est la nature de ce pic à 18,7 min qui est présent dans les incubations de 3A4 et de 3A5 avec SG, des standards de β -ZOL et de β -ZAL et une solution d'OH-ZEN purifiée à partir d'incubations réalisées avec des microsomes de rats PB, sont ajoutés à une incubation de 3A4 60 minutes. Le pic répondant à m/z 333 augmente en présence d'OH-ZEN et aucun autre pic n'apparaît : nous pouvons en déduire qu'il s'agissait bien de l'OH-ZEN.

Enfin, il apparaît que les formes 1A1 et 1A2, ne forment pas d'OH-ZEN.

Finalement, seules les formes 2C8 et 3A4 permettent de quantifier le métabolisme de la ZEN en OH-ZEN. Nous avons également mesuré le taux de métabolisme de la ZEN par les microsomes humains (homme/femme) et comparé ces valeurs au taux de métabolisme de la ZEN en OH-ZEN par les microsomes de rats traités au PB qui se sont révélés être les plus efficaces pour sa formation.

Les moyennes et écarts types des concentrations sont alors calculés afin de déterminer le taux de formation du métabolite OH-ZEN en fonction du temps et de la quantité de P450 introduite.

Tableau III.7 : Moyennes et écarts types (n=4) des concentrations de ZEN et d'OH-ZEN au bout de 60 minutes en présence de différents types de microsomes (rats traités au PB, d'hommes, de femmes) ou de formes exprimées de CYP450 (2C8, 3A4).

	nmol OH-ZEN/ nmol P450/min
PB	0,17 ± 0,01
H	0
F	0,013 ± 0,002
2C8	0,046 ± 0,004
3A4	0,0037 ± 0,003

D'après le Tableau III.7, les formes 2C8 sont les plus efficaces après les microsomes de rats PB, puis viennent les CYP 3A4. Ces deux dernières formes conduisent également à la formation de plusieurs autres composés *m/z* 333 (représentant 40% et 55% respectivement de l'ensemble des composés de masse *m/z* 333) et ayant des temps de rétention différents de l'OH-ZEN étudié ici. En revanche, aucun composé de masse *m/z* 335 n'a été retrouvé. Enfin et conformément aux résultats précédents, les microsomes humains provenant exclusivement d'hommes ne métabolisent pas la ZEN en OH-ZEN.

Les CYP2C8 et 3A4 sont responsables de la formation d'un OH-ZEN, les CYP2C8 de manière plus importante (46 vs 3,7 pmol OH-ZEN/nmol P450/min). De plus, les microsomes de femmes métabolisent également la ZEN en OH-ZEN, contrairement aux microsomes d'hommes (13 vs traces pmol OH-ZEN/nmol P450/min). Ce dernier résultat est en accord avec une activité plus importante de l'isoforme 2C8 spécifiée sur les préparations microsomales de femmes que dans celles d'hommes : l'activité hydrolase spécifique du CYP2C8 était 1,8 fois plus importante dans les microsomes de femmes que dans ceux d'hommes (XenoTech LLC lot 0410044 pour les femmes et 0610050 pour les hommes). Notons enfin, que les microsomes de femmes et d'hommes forment également plusieurs composés *m/z* 335, et d'autres composés *m/z* 333, en quantité moins importantes que l'OH-ZEN I pour les microsomes de femmes. Il semblerait, en outre que ces composés se forment simultanément et qu'aucun ne disparaisse au cours du temps d'incubation.

Il resterait à vérifier dans quelle mesure le métabolite OH-ZEN est présent *in vivo* chez l'animal traité à la ZEN et quels sont les cytochromes prédominants dans le foie des animaux traités.

III-3.3. Effets d'inhibiteurs (spécifiques) de P450 humains sur la formation d'OH-ZEN par des microsomes de rats.

Nous nous sommes enfin intéressés à l'effet d'inhibiteurs classiques de cytochromes humains (Tableau III.8) sur la formation de l'OH-ZEN par des microsomes de rats PB. En effet, le métabolisme de la ZEN sur des microsomes humains étant trop faible, nous avons préféré utiliser des microsomes de rats PB de manière à mesurer des modifications significatives du métabolisme en présence de ces inhibiteurs spécifiques.

50 μ M de ZEN ont été incubés avec des microsomes de rats PB et 20 μ M des inhibiteurs (excepté pour le kétoconazole utilisé à 2 μ M) pendant 30 minutes. Des incubations témoins en présence de 5% de DMSO et sans inhibiteur ont été menées en parallèle et ont été utilisées comme référence : le 100% a été défini pour la quantité d'OH-ZEN formée dans ces incubations témoins.

Tableau III.8 : Inhibiteurs classiques de cytochromes humains

Inhibiteurs	CYP inhibé	% OH-ZEN formé/témoin
α -naphthoflavone	1A1	109%
Furafylline (1A2)	1A2	110%
Tranlycypromine	2A6	19%
Ticlopidine	2B6	48%
Triméthoprime	2C8	97%
Taxol (2C8)	2C8	114%
Gemfibrozil	2C8	117%
Sulfaphénazole	2C9	105%
Quinidine	2D6	104%
Méthylpyrazole	2E1	107%
Chlorzoxazone	2E1	112%
TriAcetyl Oléandomycine	3A4	106%
Kétoconazole	3A4	59%

Les pourcentages (n=2) de formation de l'OH-ZEN dans les incubations en présence des différents inhibiteurs spécifiques de CYPs humains sont calculés par rapport aux incubations contrôle de rats PB sans inhibiteurs (100%).

Ainsi seul le tranlycypromine, la ticlopidine ou le ketoconazole inhibent significativement la formation de l'OH-ZEN alors que les inhibiteurs du CYP2C8, le taxol et le gemfibrozil n'ont

eu aucun effet inhibiteur. Par ailleurs, la formation de l'OH-ZEN par des microsomes de rats PB peut être inhibée par le tranylcypromine et la ticlopidine, composés connus comme inhibiteurs des CYP2A6 et 2B6 humains respectivement (Draper *et al.*, 1997; Rendic, 2002).

Les effets des inhibiteurs spécifiques de CYP humains sur la formation de l'OH-ZEN par des microsomes de rats PB ne sont donc pas en accord avec les résultats attendus avec les inhibiteurs de 2C8. Néanmoins, les cytochromes de rat et les cytochromes humains ne présentent pas les mêmes activités catalytiques et les équivalences entre isoformes des deux espèces sont encore assez mal documentées.

Cette différence entre les effets des inhibiteurs sur des microsomes de rat ou d'homme pourrait provenir d'une sélectivité différente des inhibiteurs sur les cytochromes de rat et sur ceux d'homme (Shimada *et al.*, 1997).

III-3.4. Cytochromes P450s de rat

Pour expliquer les différences entre les résultats avec des inhibiteurs des formes humaines et les activités mesurées sur les formes exprimées humaines, nous nous sommes intéressés à certaines formes exprimées chez le rat (disponibles commercialement). En effet, les résultats de travaux expérimentaux menés en parallèle par Radu Duca sur l'expression induite de cDNA de rats traités par les différents inducteurs de P450s, montrent que les formes 2C étaient induites par un traitement à la ZEN. Ceci est en accord avec nos résultats précédents et pour étoffer nos affirmations, nous avons sélectionné plusieurs CYP de rat disponibles dans le commerce et qui pourraient avoir des homologies avec le 2C8 humain : 2C6, 2C11, 2C12 et 2C13¹ (Sigma).

Des incubations de 60 minutes ont alors été effectuées dans les conditions classiques avec 50 µM de ZEN et 1 µM de chaque P450, à pH 7,4 puis les surnageants ont été analysés directement par couplage LC-MS.

Les chromatogrammes de la Figure III.10 montrent que les formes 2C6, 2C11 et 2C13 forment le métabolite hydroxy OH-ZEN identique au composé majoritaire formé dans des incubations avec des microsomes de rats PB (Figure III.10 E) ou avec des microsomes humains (pics entourés sur la Figure III.10).

¹ Malgré une importante activité des formes 2C7 d'après les travaux de Radu Duca, nous n'avons pu étudier leur rôle dans la formation de l'OH-ZEN car elles n'étaient pas commercialisées.

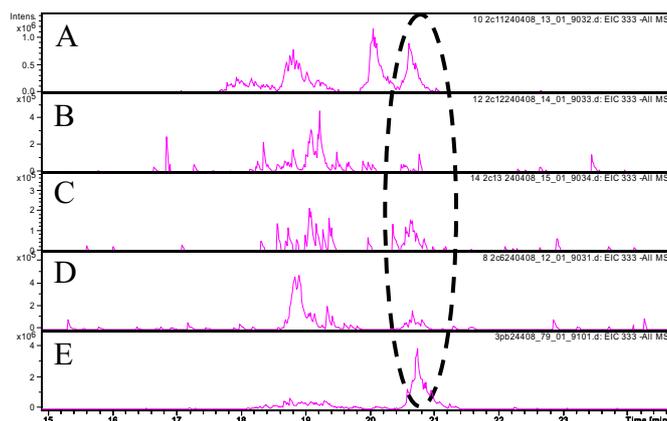


Figure III.10 : Chromatogrammes des ions de m/z 333 extraits des incubations de ZEN avec des formes 2C de rat. A : CYP 2C11 ; B : CYP 2C12 ; C : CYP 2C13 ; D : CYP 2C6 ; E : microsomes de rats traités au PB.

On note également que plusieurs formes d'OH-ZEN sont présentes dans les différentes incubations. En effet il existe jusqu'à 5 formes différentes d'hydroxy-zéaralénone (le groupement OH devant se former sur différents carbones de la partie aliphatique de la ZEN, cf étude structurale qui suit, en particulier les analyses de masse haute résolution).

Ainsi, les formes 2C6, 2C11, 2C12 et 2C13 sont capables de former différents métabolites mono-hydroxylés de la ZEN.

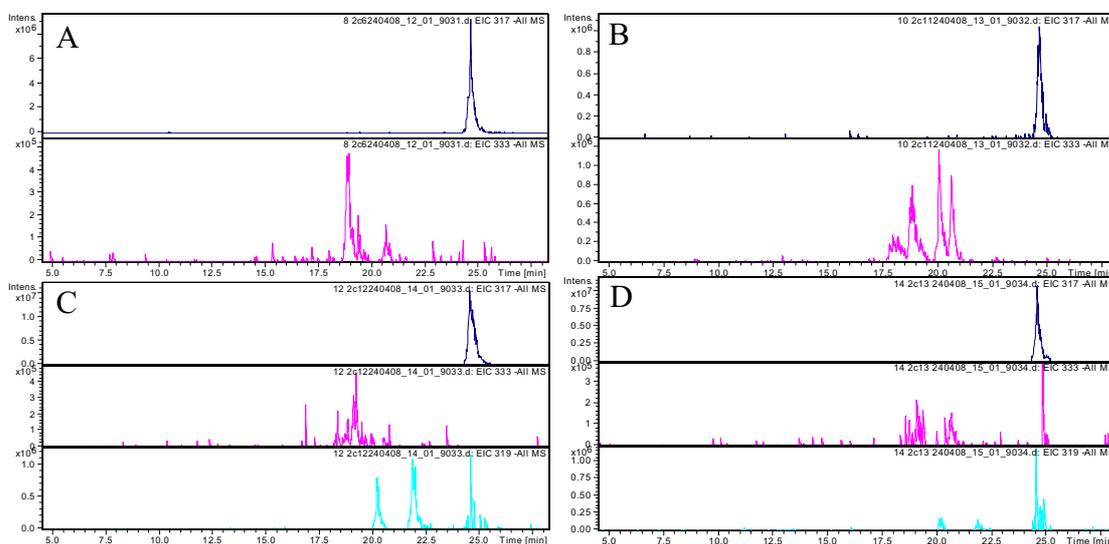


Figure III.11 : Chromatogrammes de ZEN (m/z 317 : bleu foncé), d'OH-ZEN (m/z 333) ou de ZOL (m/z 319) pour les incubations de ZEN avec CYP 2C6 (A), 2C11 (B), 2C12 (C) et 2C13 (D) de rat.

Remarque : le signal répondant à m/z 319 au temps de rétention de la ZEN correspond au pic M+2 de la ZEN (environ 1% de l'aire du pic de la ZEN à m/z 317). D'autre part, les signaux à m/z 319 n'ont pas été représentés pour les incubations de ZEN avec du CYP 2C6 (A) et 2C11 (B) car aucun pic ne répondait à cette masse.

Si nous nous intéressons plus spécifiquement à la forme ayant ici un temps de rétention de 20,8 minutes, nous pouvons calculer les taux de métabolisme par les différentes formes de CYP (Tableau III.9).

Tableau III.9 : Taux de métabolisme de la ZEN en OH-ZEN (RT = 20,7 min) par différentes formes exprimées de CYP de rat.

	pmol OHZEN /nmol P450/min ¹	% OH-ZEN I/ Aire totale 333 <i>m/z</i>
rats PB	167	100
2C6	6	15
2C11	40	21
2C12	0	0
2C13	9	43

La troisième colonne représente le pourcentage d'OH-ZEN produit par les microsomes de rats PB (OH-ZEN I) par rapport à l'ensemble des métabolites hydroxy *m/z* 333 formés par les différentes formes exprimées de rat.

Ici, nous pouvons constater que la forme 2C11 métabolise mieux que les autres la ZEN en OH-ZEN (RT = 20,7 min). De plus, si l'ensemble des composés hydroxylés de la ZEN est pris en compte (*m/z* 333), le CYP 2C11 de rat produit plus de 10 fois plus d'OH-ZEN (toutes formes confondues) que le CYP 2C13 de rat.

Ce dernier résultat est à rapprocher des résultats que nous avons obtenus avec des formes exprimées humaines : les CYP 2C8 humains étaient alors responsables (entre autres) de la formation de cette forme d'OH-ZEN. Une étude comparative plus spécifique des séquences d'acides aminés de ces deux protéines (2C11 de rat et 2C8 humain) pourrait nous indiquer une similitude qui serait à l'origine de la prise en charge du métabolisme de la ZEN en OH-ZEN par les CYP 2C8 humains. Enfin, notons qu'aucune des formes exprimées de rat testées ici ne forme spécifiquement OH-ZEN I, contrairement aux microsomes de rats PB et aux expériences menées *in vivo* : toutes forment un mélange de composés hydroxy. Par ailleurs, aucune n'ayant une activité comparable à celle des microsomes de rats PB, il reste à tester l'activité des formes 2C7 de rat qui étaient indisponibles au moment de notre travail expérimental et qui pourraient être responsables de la formation de l'OH-ZEN I chez les rats.

III-4. Conclusions

Après avoir repéré et optimisé la formation d'un nouveau métabolite hydroxylé dans les incubations de ZEN avec des microsomes de rats PB, nous nous sommes intéressés de plus

¹ Ici encore nous n'avons pas vérifié la linéarité de la formation de l'OH-ZEN par les formes exprimées. Nous n'avons calculé les taux de formation qu'au bout de 60 minutes et ramené ces taux par unité de temps.

près aux CYPs responsables d'une telle transformation. En travaillant d'abord sur des formes exprimées humaines, nous avons déterminé que seules les formes 2C8 et 3A4 humaines conduisent à une quantité significative d'OH-ZEN. Enfin des études complémentaires sur des formes exprimées de rat ont montré que le CYP 2C11 est particulièrement efficace pour former ce nouveau composé et présente une activité métabolique analogue au CYP 2C8 humain.

Des homologies de séquences entre les CYP 2C8 humain et CYP 2C11 de rat pourraient venir corroborer ces résultats.

IV. Activité oestrogénique de l'OH-ZEN (Patrick Balaguer)

La ZEN et ses métabolites font partie des composés dits perturbateurs endocriniens. En effet, ils exercent leurs effets oestrogéniques à travers des récepteurs oestrogéniques (ER α et ER β) qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Au cours du mécanisme d'action classique, le récepteur activé du 17 β -estradiol (E₂) se fixe directement sur l'ADN et recrute par la suite différents types de coactivateurs de transcription qui modifient la structure de la chromatine. Des souris knock-out (KO) aux récepteurs oestrogéniques (ER α), sont infertiles (males comme femelles), voient leur densité osseuse diminuer et présentent des perturbations au niveau du développement mammaire. En revanche des souris KO au ER β se développent normalement mais les femelles ont une fertilité très réduite. Des cellules MCF-7¹ qui expriment les ER α prolifèrent normalement en présence de composés oestrogéniques. Dans ces cellules, ZEN et α -ZOL activent aussi le cycle de progression cellulaire.

Depuis la première étude de Boyd et Wittliff (1978) plusieurs études ont confirmé que la ZEN et ses métabolites agissaient comme des agonistes/antagonistes compétitifs sur les deux types de récepteurs oestrogéniques (Boyd et Wittliff, 1978; Shier *et al.*, 2001). D'autres études avec des fractions subcellulaires de plusieurs organes comme l'hypothalamus, le foie, l'utérus ou les glandes mammaires de différentes espèces ont montré que les affinités relatives de la ZEN et de ses métabolites variaient entre < 0,01 et 0,10 de l'activité du 17 β -estradiol, l' α -ZAL ayant l'activité la plus importante de tous les métabolites. Des mesures comparatives des affinités relatives au récepteur cytoplasmique de l'utérus de rat ont montré l'ordre suivant : α -ZAL > α -ZOL > β -ZAL > ZEN > β -ZOL (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

¹ Lignée de cellules humaines tumorales mammaires la plus utilisée dans les laboratoires de recherche sur le cancer du sein

C'est pourquoi, il nous est paru important de nous intéresser à l'activité oestrogénique de ce nouveau métabolite OH-ZEN afin de la comparer aux activités connues des autres métabolites de la ZEN.

Cette étude expérimentale a été réalisée par Patrick Balaguer¹.

IV-1. Les récepteurs oestrogéniques

L'activité oestrogénique du métabolite OH-ZEN a été mesurée sur des lignées cellulaires ER α et β qui manifestaient de manière constante une réponse oestrogénique via la luciférase sous le contrôle des récepteurs hER- α ou hER- β . Ces activités ont été comparées à celles de la ZEN et de l' α -ZAL. Dans ces lignées cellulaires, les deux métabolites et la ZEN ont induit une expression de la luciférase, fonction de leur concentration, mais avec des intensités différentes indiquées par leur EC₅₀s (Tableau III.10). L'utilisation de ces cellules, nous a permis de confirmer l'activité oestrogénique de la ZEN et dans une plus large mesure, celle de l' α -ZAL. Ces mesures nous ont enfin permis de montrer une activité non nulle de l'OH-ZEN vis-à-vis de ces récepteurs.

Tableau III.10 : EC₅₀ de la ZEN, de l' α -ZAL et de l'OH-ZEN sur les lignées cellulaires ER α et ER β . Les concentrations ont été déterminées par la mesure de la luminescence des solutions.

EC ₅₀	α -ZAL	ZEN	OH-ZEN
ER α	0,49 \pm 00,9 nM	11,78 \pm 1,9 nM	70,31 \pm 15,55 nM
ER β	0,93 \pm 0,2 nM	11,46 \pm 2,5 nM	40,27 \pm 21,89 nM

IV-2. Conditions expérimentales

Les lignées transfectées HELN-ER α et β ont été obtenues comme décrit dans les articles suivants (Balaguer *et al.*, 1999; Escande *et al.*, 2006). Brièvement, la génération des lignées cellulaires HELN-ER α et β s'est faite en deux étapes. Le gène promoteur sensible aux œstrogènes a été transfecté de manière stable dans des cellules HeLa, générant ainsi une lignée cellulaire HELN. Dans un second temps, ces cellules HELN ont été transfectées avec des plasmides -ER α , -ER β pour obtenir respectivement des lignées cellulaires HELN-ER α et -ER β . Les cellules HELN-ERs ont alors été mises en culture dans du DMEM F12 sans rouge de phénol, avec 6% de dextran-coated charcoal (DCC) traité au FCS (6% DCC-FCS), 1% d'antibiotique, 1 mg/mL de G418 et 0,5 μ g/mL de puromycine. L'activité basale de la

¹ INSERM, U896, Montpellier F-34090, France; Université Montpellier 1, Montpellier F-34298, France.

luciférase dans les cellules HELN-ERs était autour de 10% de l'activité maximale obtenue (100%) avec 10 nM d'estradiol (E₂).

Les cellules promotrices ont étéensemencées avec une densité de 50 000 cellules par puits sur une plaque de 96 puits, dans 150 µL de milieu de culture. Les composés que nous voulions tester ont été concentrés quatre fois dans le même milieu et 50 µL ont été ajoutés par puits huit heures après les ensemencements. Les lignées cellulaires ont été incubées 16 heures avec les composés à 37°C. A la fin des expositions, le milieu contenant les composés test a été récupéré et remplacé par du milieu de culture contenant 0,3 nM de luciférine. A cette concentration la luciférine diffuse dans les cellules et produit un signal luminescent stable 5 minutes après. Ce signal est approximativement dix fois moins intense que le signal obtenu après la lyse des cellules mais reste parfaitement constant pendant plusieurs heures. La plaque 96 puits est alors introduite dans un luminomètre Microbeta Wallac (Centro LB 960, Berthold Technologies) qui mesure pendant deux secondes la luminescence dans les cellules vivantes intactes.

Pour étudier les activités agonistes des hER α et hER β , les cellules HELN-ERs ont été exposées à des concentrations croissantes de ZEN, d' α -ZAL et d'OH-ZEN (0,01 nM – 1 µM). Les mesures ont été réalisées 3 fois pour chaque point (chaque concentration est répétée 4 fois sur une même plaque). Les résultats ont été exprimés comme le pourcentage de l'activité maximale de luciférase obtenue en présence de 10 nM d'estradiol.

Des tests ont été réalisés en parallèle afin de s'assurer de la spécificité des activités agonistes. Pour ce faire, les lignées cellulaires parentes HELN ont été utilisées (non transfectées avec ER α et ER β). Dans ces cellules, l'activation de la luciférase a été mesurée en présence d'une concentration croissante des composés. Si aucune activation des cellules HELN n'était observée avec les composés, l'activité observée dans les échantillons sur les cellules HELN ER α et ER β pouvait alors être considérée comme spécifique.

IV-3. Activité de l'OH-ZEN

Une fois la spécificité vérifiée avec les cellules HELN contrôle, nous avons observé que toutes les réponses étaient spécifiques à des concentrations inférieures à 1 µM.

Les courbes dose-réponse, autant pour la ZEN que pour l' α -ZAL et l'OH-ZEN, montrent que l'activité oestrogénique est similaire sur les ER α et sur les ER β .

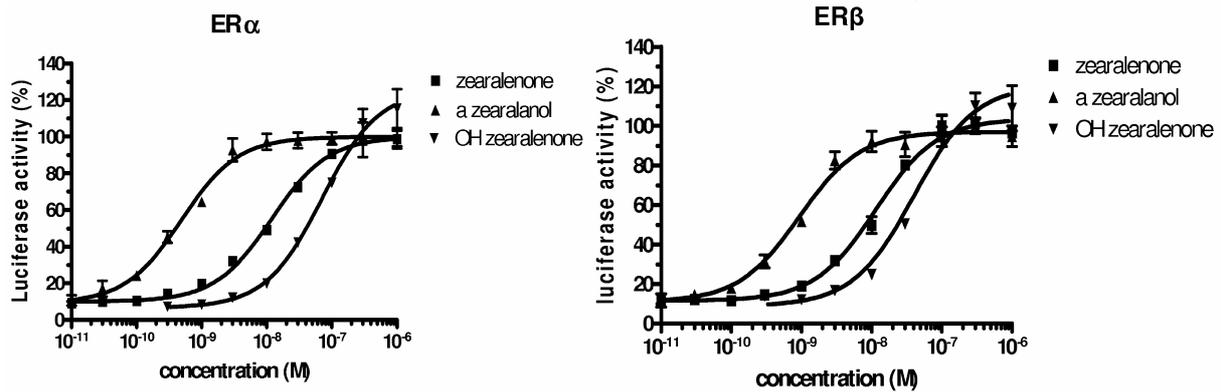


Figure III.12 : Activité de la luciférase sur les hER α (A) et sur les hER β (B) avec différentes concentrations de ZEN (◆), d' α -ZAL (■) et d'OH-ZEN (▼).

50 nM d'OH-ZEN sont nécessaires pour avoir une activité de 50% en luciférase sur ER α alors que 8 nM de ZEN ou 0,4 nM d' α -ZAL suffisent. Pour le récepteur ER β , environ 25 nM d'OH-ZEN sont nécessaires pour obtenir une activité en luciférase de 50% alors que seulement 8 nM de ZEN et 0,6 nM d' α -ZAL suffisent. Cela signifie que l'affinité des substrats pour ER α et ER β respectent l'ordre suivant : OH-ZEN < ZEN < α -ZAL.

IV-4. Conclusions

Les mesures et la comparaison de l'activité de l'OH-ZEN et des principaux composés actifs dérivés de la ZEN via la luminescence de la luciférase, nous ont permis de classer ce nouveau métabolite par rapport à la ZEN et à l' α -ZAL pour les deux récepteurs ER α et ER β : OH-ZEN < ZEN < α -ZAL. Bien que l'activité propre de l'OH-ZEN soit limitée, ce dernier résultat est intéressant dans la mesure où un autre métabolite hydroxy de la ZEN synthétisé directement par les champignons (5 OH-ZEN avec la numérotation des carbones utilisée dans la Figure III.13 ci-après) ne présentait quant à lui aucune activité oestrogénique (El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1988), contrairement au métabolite que nous avons mis en évidence de notre côté.

Si les méthodes *in vitro* sont essentiellement axées sur les interactions avec des récepteurs choisis pour évaluer le potentiel hormonal ou anti hormonal d'une molécule d'après ses courbes doses-réponses, il reste néanmoins très important de déterminer quels sont les principaux facteurs qui interviennent au niveau des mécanismes d'action *in vivo* de ce métabolite endogène OH-ZEN. Ceci est l'objet de la thèse de Radu Duca.

V. Identification structurale de l'OH-ZEN

V-1. Formation des analogues

Afin de déterminer si les analogues¹ de la ZEN (α/β -ZOL, ZAN et α/β -ZAL) sont capables de former des métabolites hydroxy, nous avons essayé de former, dans les mêmes conditions *in vitro* que pour la ZEN (pH 7,4 et 1 μ M P450s microsomes rats PB), un métabolite mono-hydroxylé à partir des analogues de la ZEN.

Des incubations de ZEN, ZAN, α -ZOL, β -ZOL, α -ZAL et β -ZAL ¹²C à 50 μ M en présence de microsomes de rats PB ont donc été réalisées.

Afin de se placer dans les meilleures conditions pour des analyses MSⁿ, les fractions contenant le métabolite hydroxy sont injectées sans colonne séparative, c'est-à-dire directement en infusion, plutôt qu'en injection, en mode négatif (formation de l'anion correspondant à la perte d'un ou plusieurs hydrogènes). Pour cela les surnageants sont préalablement purifiés sur une colonne Sep-pack (voir conditions détaillées au chapitre VI) pour, entre autre, éliminer le NADPH présent en forte concentration et risquant de masquer le signal du spectromètre de masse.

Quant aux standards de ZAN, α -ZAL, β -ZAL, α -ZOL et β -ZOL à 5. 10⁻⁵M (mélange eau/ACN 50:50 + 10 mM d'acétate d'ammonium), ils sont passés en mode infusion, toujours en mode négatif.

Nous avons alors trouvé que chaque analogue forme un métabolite hydroxy à pH 7,4, en présence de microsomes de rats PB, mais dans des proportions différentes (Tableau III.11).

¹ Molécule ayant une structure chimique similaire à la ZEN.

Tableau III.11 : Fragments de la ZEN, de ses analogues et de leur métabolite hydroxy majoritairement formé.

	Rt (min)	nmoles/min/nmoles P450	M	M-18	M-28	M-36	M-44	M-62	M-82	M-88
ZEN	24,1				289		273	255		
ZAN	24,1		319	301 (27%)			275 (100%)	257 (6%)		
ZOL	21,6 (α) 19,9 (α)		319	301 (44%)			275 (100%)	257 (18%)		231 (3%)
ZAL	21,3 (α) 24,1 (β)		321	303 (31%)			277 (100%)	259 (5%)		233 (3%)
OH-ZEN	20,3	0,2	333	315 (100%)	305 (23%)		289 (67%)	271 (47%)		245 (56%)
OH-ZAN	19,9	0,1	335	317 (100%)			291 (77%)	273 (35%)		247 (7%)
OH-ZOL	18,3 (α) 19,9 (β)	0,1 (α) 0,04 (β)	335	317 (45%)	307 (6%)	299 (11%)	291 (100%)	273 (23%)	253 (25%)	
OH-ZAL	18,1(α) 16,3 (β)	0,1 (α) 0,04 (β)	337	319 (46%)	309 (2%)		293 (7%)	275 (27%)	255 (100%)	

Les temps de rétentions ont été mesurés avec les conditions d'éluion standards précisées au chapitre VI (10% de solvant B pendant 2 minutes, suivi d'un gradient linéaire atteignant 80% de solvant B à 22 minutes. Après 2 minutes à 80% de B, le système retourne aux conditions initiales en 2 minutes). Les taux de métabolisme ont été déterminés à partir des analyses des spectres LC-MS.

M-18 correspond à une perte d'eau H₂O ; M-28 correspond à une perte de CO ; M-36 correspond à une perte de 2H₂O ; M-44 correspond à une perte de CO₂ ; M-62 correspond à une perte de H₂O et de CO₂ ; M-82 correspond à une perte de (CO₂, C₃H₂) ; M-88 correspond à une perte de (CO₂, H₂O, C₂H₂) ou de (CO₂, C₃H₈).

Afin de comparer la structure des analogues hydroxylés, nous avons analysé et comparé les fragmentations de chaque paire substrat/métabolite hydroxy le plus abondant, avec un spectromètre de masse de type trappe d'ions (Tableau III.11). Les masses indiquées en gras dans ce tableau correspondent à des fragments similaires entre analogues et leur métabolite hydroxylé (ZEN et OH-ZEN, ZAN et OH-ZAN, etc.), avec une différence de masse constante égale à 16 (ce qui correspond à la masse apportée lors de l'addition d'un atome d'oxygène).

Les pertes de masse des métabolites hydroxylés sont très semblables à celles de leur produit parent, en particulier les pertes de 18 (M-H₂O) et 44 (M-CO₂). Néanmoins ces deux pertes ne suffisent pas à la localisation du groupe OH. Nous pouvons aussi remarquer que des pertes de fragments plus importants (M-88) ne sont pas conservées d'un analogue à son métabolite hydroxylé, selon le degré d'oxydation de l'analogue. Quand ZOL et ZAL forment le M-88, (correspondant à une perte de CO₂ et C₃H₆ ou de CO₂, H₂O et C₂H₂ sur la boucle aliphatique de C₁ à C₄) leurs métabolites correspondants OH-ZOL et OH-ZAL ne forment pas le M-88. En revanche, quand la ZEN et la ZAN ne forment pas ce M-88, leurs métabolites hydroxylés le forment. Dans la mesure où cette importante perte de masse pourrait concerner la partie de

la molécule contenant le groupement CO ou le groupement OH (les cassures se font jusqu'au C₆ ou au C₈), nous pouvons penser que les métabolites hydroxylés des analogues n'ont pas nécessairement la même structure et que cette dernière dépend de la présence d'un groupe carbonyle ou d'un groupe alcool sur le C₇.

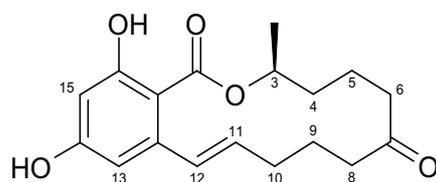


Figure III.13 : Numérotation des atomes de carbone de la ZEN et de ses analogues.

Ainsi, en faisant des hypothèses sur les structures des fragments restants et en considérant que les cassures ont lieu sur la partie aliphatique des molécules (en commençant par le C₍₁₎OO-C₍₃₎ pour tous les composés) nous pouvons alors supposer dès lors que le groupe OH est localisé sur la seule partie de la molécule qui est conservée au cours des fragmentations successives, *i.e.* après le C₆.(C₈ à C₁₂)

V-2. Orbitrap: spectrométrie de masse très haute résolution

Afin d'aller plus loin dans l'investigation de la structure de l'OH-ZEN majoritairement formé dans les incubations de ZEN avec des microsomes de rats PB, nous avons choisi d'utiliser un spectromètre de plus grande résolution. Les analyses expérimentales sur l'orbitrap ont été réalisées au Service de Pharmacologie et d'Immuno-analyses (SPI) du CEA de Saclay par Erwan Werner¹.

L'analyse en mode négatif, d'une incubation de ZEN avec des microsomes de rats PB par couplage HPLC-orbitrap (spectromètre de masse très haute résolution) nous a permis de révéler la présence de 5 métabolites donnant des pics à m/z 333,13 et absents des analyses des incubations témoin sans système générateur (Figure III.14).

¹ CEA Saclay, iBiTec-S, SPI, Gif sur Yvette Cedex F-91191, France

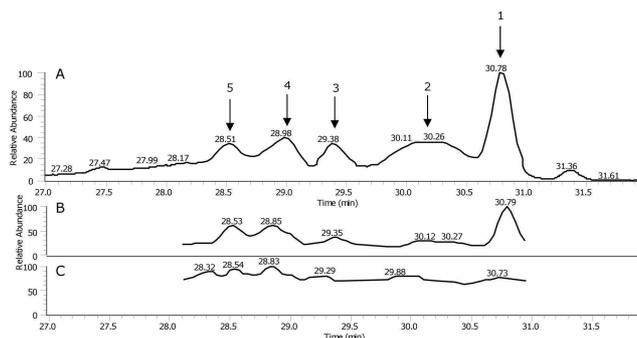


Figure III.14 : HPLC UV et spectre de masse haute résolution en mode négatif des métabolites OH-ZEN, formés dans des incubations *in vitro* avec des microsomes de rats PB.

Ion extrait de masse m/z 333,13 HPLC-MS (A), HPLC-MS² (B), HPLC-MS³ (C).

La formule brute déduite de la masse exacte (calculs tenant compte des abondances isotopiques naturelles) pour ces cinq composés est C₁₈H₂₂O₆, *i.e.* des composés pouvant être des métabolites mono-oxygénés de la ZEN (C₁₈ H₂₂O₅). Le moins polaire (Rt 30,78 minutes, Figure III.14), montre le signal le plus intense autant par son intensité UV à 280 nm que par son signal MS à m/z 333,13. Cette analyse est en accord avec les résultats exposés précédemment et obtenus sur un spectromètre trappe d'ions.

Ces cinq métabolites mono hydroxylés ont conduit à des fragments similaires avec des intensités relatives différentes (Tableau III.12).

Tableau III.12 : Masses exactes des différents métabolites OH-ZEN ayant un rapport m/z de 333,13 en mode ESI négatif.

	RT (min)	MS ² of m/z 333,13	MS ³ of m/z 333,13 → 289,14
OH-ZEN1	30,78	305,14 ; 289,14 ; 271,13 ; 247,09 ; 191,03 ; 187,04 ; 175,04 ; 161,06 ; 149,06	271,13 ; 202,07 ; 175,04 ; 161,06 ; 149,06
OH-ZEN2	30,15	305,14 ; 289,14 ; 271,13 ; 247,09 ; 191,03 ; 187,04 ; 175,04 ; 161,06 ; 149,06	271,13 ; 202,06 ; 169,28 ; 149,06
OH-ZEN3	29,38	297,11 ; 289,14 ; 271,13 ; 187,04 ; 175,04 ; 161,06 ; 149,06	271,13 ; 202,06 ; 189,09 ; 161,06 ; 149,06
OH-ZEN4	28,95	305,14 ; 297,11 ; 289,14 ; 271,13 ; 191,03 ; 187,04 ; 175,04 ; 161,06 ; 149,06	271,13 ; 231,10 ; 202,07 ; 161,06 ; 149,06
OH-ZEN5	28,51	305,14 ; 297,11 ; 289,14 ; 271,13 ; 191,03 ; 175,04 ; 161,06 ; 149,06	271,13 ; 231,10 ; 202,07 ; 161,06 ; 149,06

Les fragments en gras sont ceux qui sont communs à tous les OH-ZEN ; les fragments soulignés sont les fragments majoritaires.

Les proportions différentes des fragments formés indiquent que les composés de masse m/z 333,13 seraient des isomères de position. De plus, les fragmentations MS^3 de l'ion m/z 289,14 (provenant d'une perte de 44, *i.e.* du résidu carbonyle) montrent que les fragments primaires ou secondaires à m/z 271,13 (perte de 18,01 : H_2O), m/z 202,06 (perte de 87,08 : $C_5H_{11}O$) et m/z 149,06 (perte de 140,08 : $C_7H_8O_3$), sont identiques et sont toujours formés quel que soit l'OH-ZEN. Cela ne nous indique pas encore la localisation exacte du groupement OH : une analyse plus précise des fragments de l'ion m/z 271,13 (MS^4) aurait été utile mais nous ne disposons pas de suffisamment de produit pour cela. Nous avons néanmoins fait des hypothèses qui se sont vues confirmées par des analyses complémentaires de spectrométrie de masse en phase gazeuse (*cf* paragraphes suivants).

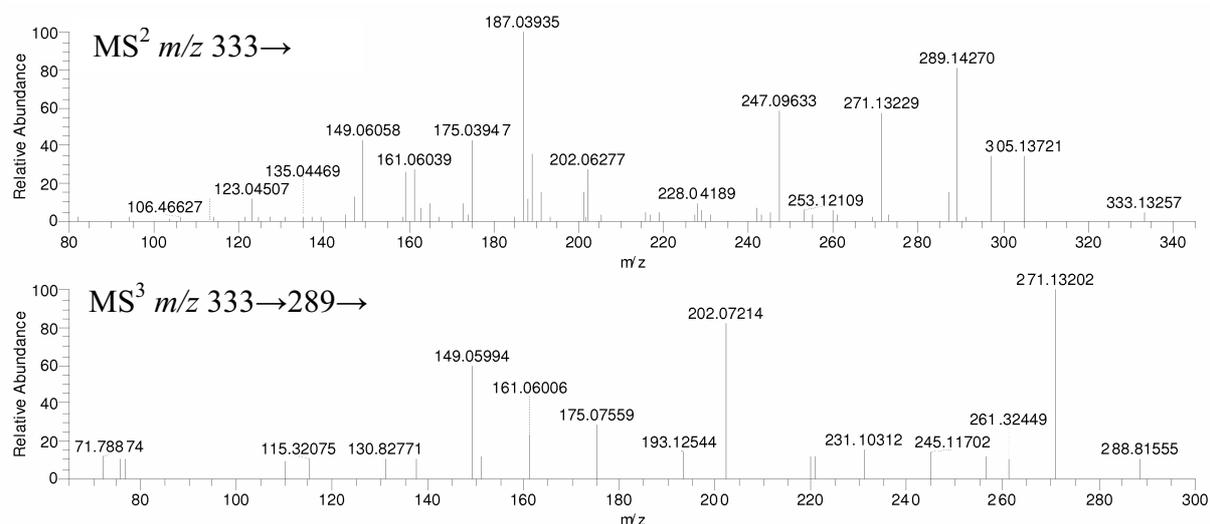


Figure III.15 : Fragmentation (MS^2) de l'OH-ZEN1 à m/z 333,13 (haut) et spectre de collision de l'ion m/z 289,14 (MS^3 333,13 \rightarrow 289,14, bas).

En considérant les fragments précédemment formés à partir des OH-ZEN, plusieurs hypothèses de localisation du groupe OH ont pu être avancées grâce à la grande précision de masse : le groupement OH pourrait être sur un carbone vicinal du groupe carbonyle de la boucle aliphatique (C_6 et C_8). Nous pouvons alors proposer les structures possibles des fragments successifs pour le métabolite majoritaire OH-ZEN1 (Figure III.16).

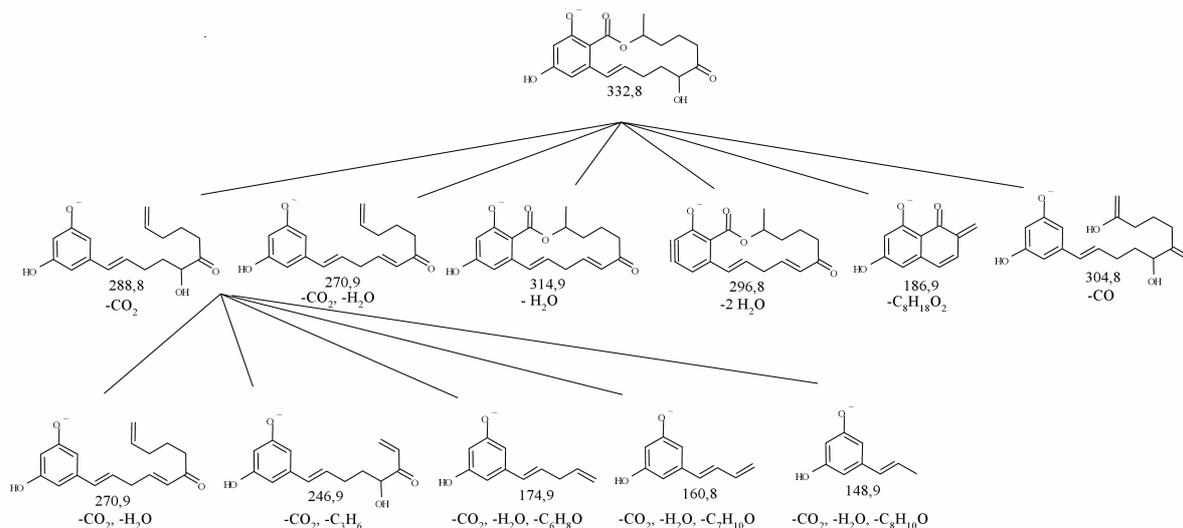


Figure III.16 : Proposition de fragmentations possibles de l'ion m/z 333,13 (OH-ZEN 1) au cours des différentes collisions.

Avec nos conditions d'éluion nous avons observé pour les deux diastéréoisomères α -ZOL et β -ZOL, également formés, des différences de temps de rétention du même ordre de grandeur que pour les différents OH-ZEN formés (2 minutes entre les ZOLs et environ 1,5 minute entre les OH-ZEN : $\Delta RT_{OH-ZEN1-OHZEN3} = 1,4$ min et $\Delta RT_{OH-ZEN2-OHZEN5} = 1,6$ min). Ceci nous laisse penser que certains des hydroxy formés sont diastéréoisomères, *i.e.* possèdent le groupe OH sur le même carbone mais avec une configuration absolue différente (Figure III.17).

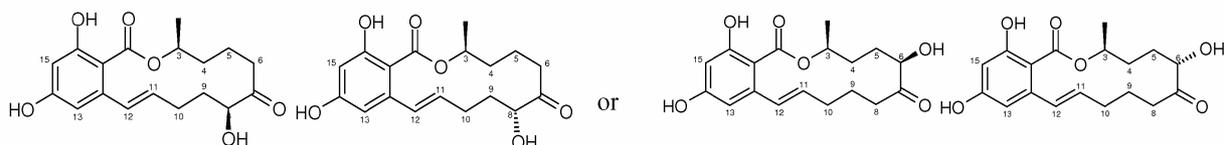


Figure III.17 : Quatre structures possibles des OH-ZEN formés dans des incubations de ZEN.

Ces positions possibles du groupe OH ont été déduites des comparaisons des fragmentations des OH-ZEN. Leurs différences relatives de temps de rétention sur les chromatogrammes sont comparables à celles des diastéréoisomères α - et β -ZOL.

V-3. GC-MSⁿ

Après une purification partielle par HPLC semi-préparative, un échantillon d'OH-ZEN formé lors d'incubations de ZEN par des microsomes de rats PB est analysé en mode d'ionisation positive par GC-HRMS et GC-MS² après une dérivation au TMS (Tri Méthyl Silane) sur les

fonctions OH de la molécule. Ces analyses ont été réalisées au LABERCA¹ de l'école vétérinaire de Nantes par Fabrice Monteau et Bruno Le Bizec.

Dans ces conditions, la ZEN silylée présente un pic à m/z 463 en mode positif (ZEN-TMS), provenant de la dérivation des deux groupements OH aromatiques de la ZEN.

Par la suite, les masses indiquées correspondront à des composés non chargés.

Une première séparation par chromatographie gazeuse présente là encore un mélange de 5 métabolites mono-oxygénés répondant à m/z 550 ($462+88 = \text{ZEN-TMS}+\text{OTMS}$), et qui pourraient être des isomères (*Cf* paragraphe V-2.). Seul le métabolite majoritaire a été analysé plus précisément.

Le composé à m/z 550 (Figure III.18) correspond à une molécule de ZEN silylée avec un groupement hydroxyl additionnel : la molécule de départ présentant 3 fonctions O-TMS (2 de la ZEN et une du groupe OH propre à l'OH-ZEN).

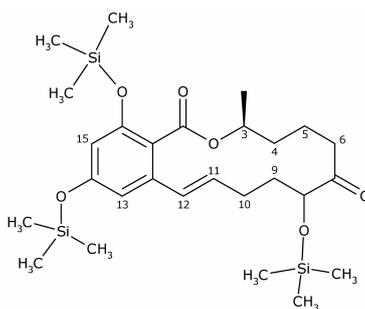
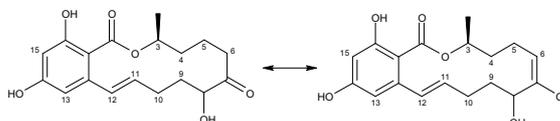


Figure III.18 : Hypothèse de structure du composé m/z 550 (OH-ZEN + 3 TMS).

Les pics observés à m/z 622 ($(\text{ZEN-TMS})+\text{OTMS}+\text{TMS} = 462+88+72$) correspondent à l'addition d'un groupe TMS supplémentaire sans modification du nombre total d'oxygènes et d'hydrogène par rapport à la ZEN (Figure III.19). Une analyse plus poussée de cet ion d'intérêt et de ses principales fragmentations a été menée et a été confirmée par haute résolution (14 000 de résolution). Une différence entre deux chromatogrammes spécifiques de cet ion nous permet de faire l'hypothèse de la présence de plusieurs isomères de position. Ces composés proviennent de l'énolisation² de la cétone. Cette réaction est favorisée quand la molécule contient un groupement OH sur le carbone vicinal de la cétone.

¹ Laboratoire d'Étude des Résidus et des Contaminants dans les aliments de l'École Nationale Vétérinaire de Nantes.



² L'équilibre céto-énolique qui a lieu est le suivant :

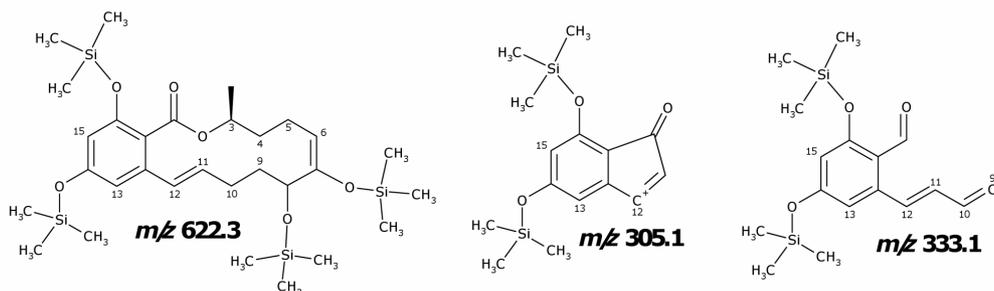


Figure III.19: Composé m/z 622 (M+160) et ses fragments m/z 305 (M-157) et m/z 333 (M-129).

La détermination plus précise de la localisation de l'OH a été réalisée en s'intéressant aux composés m/z 305 (M-157) et m/z 333 (M-129) et en comparant leurs fragmentations à celles de la ZEN. Des similarités au niveau des spectres MS² de la ZEN et du composé m/z 305 (M-157) nous a permis de conclure que ce fragment était commun à la ZEN et à l'OH-ZEN. Ceci nous a permis d'éliminer la possibilité de placer l'OH sur la partie aromatique de la ZEN. D'autre part le spectre MS² du composé m/z 333 (M-129) s'est révélé être différent de celui de la ZEN : ce composé n'est obtenu qu'en présence d'un groupement OH sur la chaîne latérale pour permettre, par fragmentation, de former une double liaison à la fin de la chaîne carbonée.

Enfin, un dernier type de dérivation a été étudié : la dérivation méthyl-boronique qui se forme spécifiquement sur deux fonctions OH voisines avec formation d'un cycle. La formation d'un composé m/z 522 nous a permis de confirmer la position exacte du groupement OH de l'OH-ZEN sur le carbone C₈ (Figure III.20).

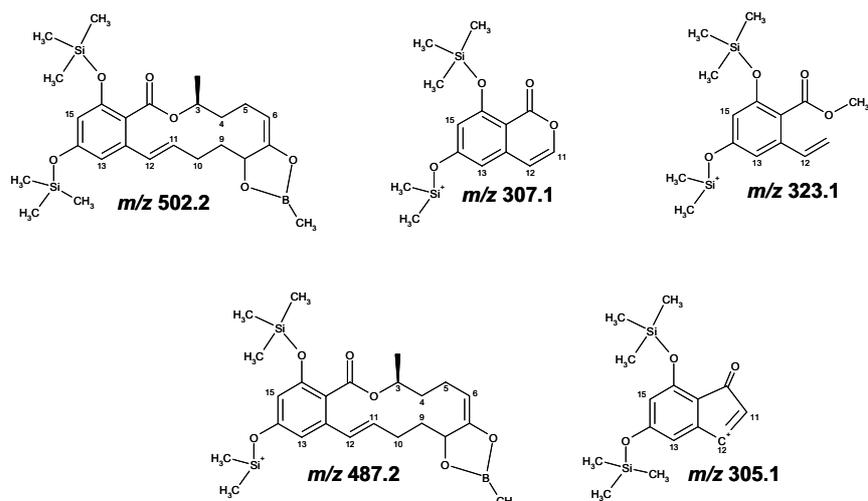


Figure III.20 : Analyse du dérivé TMS- Méthyl-boronique de l'OH-ZEN et de ses fragments.

En résumé, ces analyses ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs isomères de position OH-ZEN dans un extrait d'incubation de ZEN avec des microsomes de rats PB et ont révélé la prédominance de l'un d'entre eux, dont le groupe OH serait positionné sur le carbone voisin de la cétone sur la chaîne aliphatique de la molécule.

V-4. Discussion et conclusion

La possibilité de placer le groupement OH sur le carbone C₆ de la partie aliphatique de la ZEN a été un temps envisagée à cause de l'existence d'un métabolite hydroxy naturel de la ZEN directement produit par *Fusarium* (El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1988). Néanmoins cette hypothèse n'était pas satisfaisante au regard de notre étude dans la mesure où elle ne justifiait pas la formation de tous les fragments observés. En effet, le premier fragment correspondant à une perte de 44 correspondrait à l'ouverture de la lactone et à la perte d'un CO₂. Nous pensons que les fragments suivants sont formés à partir de cette première ouverture (perte d'une molécule d'eau – 18 –, puis perte d'un groupe C₂H₂ – 26), puis des pertes successives de groupements aliphatiques.

D'autre part, en considérant les résultats obtenus après les analyses à l'Orbitrap et en GC-MS (dérivation au TMS et dérivation méthyl-boronique), la localisation la plus probable pour le groupement OH dans l'OH-ZEN serait sur le C₈ de la ZEN (Figure III.21).

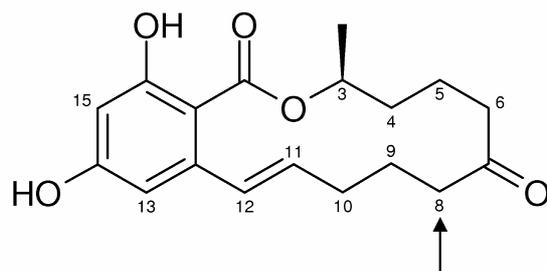


Figure III.21 : Structure probable du métabolite hydroxy de la ZEN (OH-ZEN1).

Pour aller un peu plus loin, nous avons comparé les temps de rétention de l'OH-ZEN II formé (m/z 335 : M+18) dans les incubations de ZEN avec des microsomes de rats PB avec celui des composés hydroxy formés OH-ZOL et OH-ZAN (m/z 335 : M+16) dans les incubations de ZOLs et de ZAN avec des microsomes de rats PB (Figure III.22).

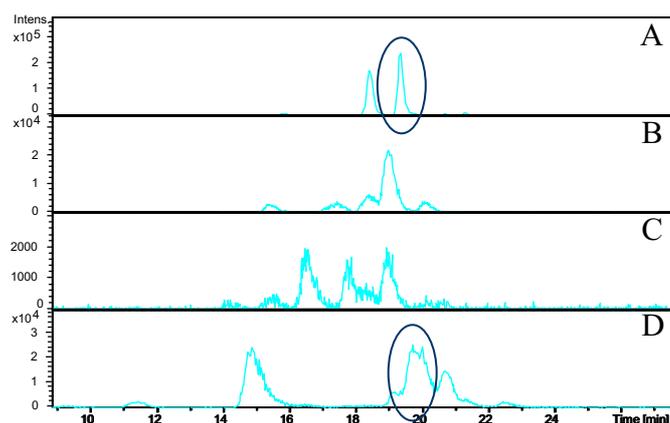


Figure III.22 : Chromatogrammes extraits (m/z 335) des incubations de ZEN (A), α -ZOL (B), β -ZOL (C) ou ZAN (D) avec des microsomes de rats PB.

Deux composés OH-ZEN sont formés (A). Le plus polaire (RT = 19,9 min) a le même temps de rétention que l'OH-ZAN.

Nous pouvons alors constater que l'OH-ZAN a le même temps de rétention (et la même masse) que l'OH-ZEN II. Ceci indiquerait que l'OH-ZEN II aurait la même structure que l'OH-ZEN I de la ZEN avec une réduction de la double liaison C₁₁-C₁₂ et l'OH sur le C₈.

VI. Discussion et conclusions

La principale voie métabolique de la ZEN est celle de la réduction en ZOL via les stéroïdes déshydrogénases. En parallèle à cette réduction, plusieurs hydroxylations ont été mises en

évidence jusque là : une première que nous avons étudiée et qui a lieu *in vitro* sur la partie aliphatique de la ZEN et une deuxième qui peut avoir lieu sur la partie aromatique de la ZEN et qui peut par la suite être méthylée par la Catechol-O-Methyl Transférase pour former un méthoxy-ZEN (Li *et al.*, 1985).

Avec nos conditions, la ZEN est métabolisée *in vivo* chez les rats et *in vitro* en utilisant des microsomes de foie de différentes espèces en au moins un métabolite mono-hydroxylé (OH-ZEN) sur la boucle aliphatique de la ZEN. D'après les études *in vivo* menées par Radu Duca, l'OH-ZEN est éliminé par les urines pendant les 24 heures qui suivent le traitement oral, en même temps que l' α -ZOL.

In vitro, les microsomes de singe et de chien produisent la plus grande quantité d'OH-ZEN. Il est intéressant de noter que les microsomes de souris et de porc ne forment pas ce métabolite en quantités détectables. Sa formation *in vitro* est stimulée par un traitement des rats au phénobarbital. Les isoformes humaines CYP 2C8 et CYP 3A4 sont capables de catalyser cette réaction alors que les autres formes exprimées humaines ne le forment pas. Par ailleurs, la formation de l'OH-ZEN par des microsomes de rats PB peut être inhibée par la tranylcypromine et la ticlopidine, connus comme inhibiteurs des CYP 2A6 et 2B6 humains respectivement (Draper *et al.*, 1997; Rendic, 2002). Cette différence entre les effets des inhibiteurs sur des microsomes de rat ou sur des formes exprimées humaines peut provenir d'une différence au niveau de la sélectivité de tels inhibiteurs sur les formes humaines ou les formes de rat (Shimada *et al.*, 1997).

Initialement la présence d'un composé hydroxylé dans les incubations de ZEN avec des enzymes du métabolisme (microsomes de rat ou P450s humains), nous a fait penser à la formation d'un catéchol. En effet, cela avait été suggéré dans la littérature (Li *et al.*, 1985). De plus, la ZEN présente une structure assez similaire à celle de l'E₂ qui forme pour sa part, des catéchols impliqués dans des processus cancérogènes. C'est pourquoi, puisque la ZEN et ses principaux métabolites sont reconnus par les récepteurs oestrogéniques, nous avons d'abord pensé que le groupe OH supplémentaire se trouvait sur le cycle aromatique. Néanmoins les analyses par spectrométrie de masse ont montré que ce groupe OH se trouvait sur la partie aliphatique de la ZEN, sur le carbone voisin de la cétone (C₈).

L'activité oestrogénique sur les récepteurs ER α et ER β s'est révélée limitée et moins importante que celles de la ZEN ou de l' α -ZAL mais néanmoins plus importante que celle du 5 hydroxy-ZEN¹ produit par les champignons et qui ne présente quant à lui aucune activité

¹ D'après la numérotation des carbones de la Figure III.21.

oestrogénique (El-Sharkawy et Abul-Hajj, 1988). L'OH-ZEN, plus qu'un composé toxique impliqué dans des processus oestrogéniques, pourrait intervenir dans des processus de détoxification du foie. Par ailleurs d'après les propriétés physico-chimiques de la ZEN, ce composé présenterait des caractéristiques idéales pour une large diffusion dans les tissus. Cela a été observé en utilisant de la ZEN radio-marquée chez le rat (Appelgren *et al.*, 1982) : la ZEN se fixe préférentiellement sur les gonades grâce à ses propriétés oestrogéniques (Takemura *et al.*, 2007).

Enfin, d'après les travaux de docking de Takemura (Takemura *et al.*, 2007) où il a superposé la ZEN et l' α -ZOL à l'estradiol E₂ dans les récepteurs ER α et ER β , le carbone 8 hydroxylé de la ZEN correspondrait au carbone 15 ou 16 de l'estradiol (Figure III.23). La superposition a été faite en partant des groupes phénol de la ZEN et de celui de l'E₂. En considérant les isoformes qui prennent en charge l'E₂ et qui agissent sur les carbones 15 et 16 nous pouvons noter que les CYP 1A1, 2A6 et 2C8, ainsi que les CYP 3A4 et 3A5 catalysent les réactions de formation des 15- α/β -OH-E₂ ou des 16- α/β -OH-E₂ (Lee *et al.*, 2003).

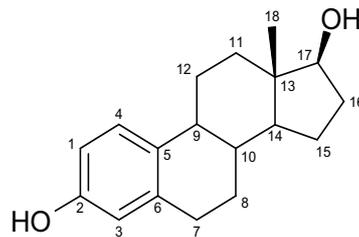


Figure III.23 : Estradiol

Il est intéressant de noter que nous retrouvons les CYP 2C8 et 3A4, impliqués dans la formation de l'OH-ZEN.

CHAPITRE IV

TRACAGE ISOTOPIQUE DU ¹³C

L'utilisation d'isotopes stables dans une molécule peut conduire à des modifications de sa reconnaissance par certains systèmes enzymatiques. Ces phénomènes appelés « effets isotopiques » sont importants pour le deutérium et peuvent atteindre dans des réactions d'arrachement d'un proton, des valeurs supérieures à 50% en faveur de l'isotope le plus abondant (proton>deutérium). Dans le cas du carbone $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, de l'oxygène $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ou de l'azote $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, ces effets seraient de l'ordre de 1 à 3% (O'Leary, 1980) et donc considérés comme négligeables pour une seule réaction enzymatique.

Nous nous sommes intéressés plus précisément à l'influence de l'enrichissement isotopique du ^{13}C sur la réactivité expérimentale et théorique de la ZEN au niveau de la formation de ses métabolites et de son transport à travers un modèle de membrane biologique.

I. Effet isotopique expérimental

L'utilisation de composés enrichis au ^{13}C et/ou ^{15}N comme standards internes est un outil de quantification extrêmement perfectionné et redoutablement efficace tant que ces composés se comportent exactement comme le composé d'intérêt étudié et ce, quel que soit l'enrichissement considéré. Ainsi, lors de notre étude du métabolisme de certains composés naturels tels que les mycotoxines, avant d'utiliser les composés enrichis comme standards internes, nous avons préalablement étudié leur comportement d'un point de vue métabolique dans les mêmes conditions que nos conditions d'études expérimentales des composés naturels correspondants. L'objectif était alors de déterminer si l'augmentation de l'enrichissement en ^{13}C influençait ou non le métabolisme de la ZEN et s'il y avait ou non une sélection/compétition d'un isotope par rapport à l'autre par les enzymes du métabolisme.

I-1. Production des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont sécrétés par des champignons qui puisent leur matière organique des plantes qu'ils envahissent ou de leurs résidus. Ainsi, afin de produire les métabolites secondaires et les mycotoxines analogues à ceux produits dans les conditions «naturelles», plusieurs productions de composés enrichis à des taux variables d'isotopes stables ont été reproduites en milieu confiné et contrôlé. Ces mélanges de composés constituent ainsi le modèle le plus représentatif des expositions de l'homme ou des animaux à ces contaminations fongiques.

I-1.1. Production de biomasse enrichie

La production de biomasse enrichie aux isotopes stables a été mise en œuvre à Cadarache dans le Groupe de Recherches Appliquées en Phytotechnologie (GRAP) du CEA de Cadarache¹, par Michel Péan. Les teneurs en $^{13}\text{CO}_2$ et $^{12}\text{CO}_2$ ont été suivies durant la culture et les teneurs d'incorporation de carbone ^{13}C ont été mesurées sur la biomasse produite. Le principe de l'enrichissement en carbone 13 de la biomasse végétale repose sur la fourniture de dioxyde de carbone enrichi en carbone 13 (CortecNet) aux végétaux. Ce dioxyde de carbone est fixé par les plantes via les processus photosynthétiques.

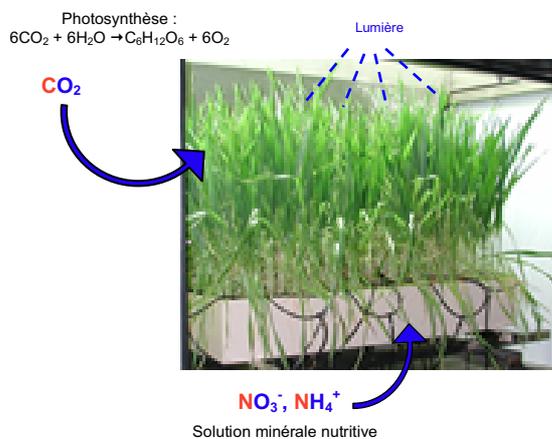


Figure IV.1 : Exemple d'une culture de blé enrichie au ^{13}C via la photosynthèse et au ^{15}N via la solution minérale nutritive dans une chambre hermétique.

La variété de blé choisie pour les cultures était 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 vernalisation² (peu exigeante) et précocité (demi-précoce),
- sensibilité à la fusariose (fortement sensible),
- production de plusieurs épis à partir d'une même pousse (graine).

¹ Direction des Sciences du Vivant - Département d'Écophysiologie Végétale et de Microbiologie - CEA Cadarache. , UMR Biol Veget & Microbiol Environ, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108, France.

² Mise à fleur par le froid : durée suffisante d'une réfrigération appropriée qui supprime les obstacles que rencontre l'initiation florale de plantes qui ne peuvent pas ou ne peuvent guère parvenir à celle-ci aux températures tièdes et normales. *Encyclopædia Universalis*, 2005

Tableau IV.1 : Production de biomasse végétale enrichie en isotope stable ^{13}C .

	Objectif	Production réelle
Cultures Blé	50% ^{13}C à floraison	353 g grains 38,10% +/-0,20 ^{13}C (n =4)
	100% ^{13}C à floraison	320 g grains 75,11% +/- 0,79 ^{13}C (n = 4)

L'apport de l'isotope n'a débuté qu'au moment de la floraison, afin de minimiser la quantité et donc le coût de carbone 13 apporté. Ceci supposait que le remplissage des grains de blé après floraison nécessitait peu de remobilisation de matière organique en provenance des parties végétatives synthétisées avant floraison (matière non enrichie). En effet, alors que dans les conditions naturelles la période de remplissage est une période de stress (température, hydrique) favorable à la remobilisation, dans nos systèmes artificiels ces conditions restaient optimales jusqu'à la récolte. Le Tableau IV.1 montre pourtant que les enrichissements obtenus sont inférieurs à ceux attendus (respectivement 75% pour 99% attendus et 38% pour 50% attendus). Ceci montre que contrairement à l'hypothèse de départ, une part importante du carbone constitutif des grains provient d'une remobilisation de carbone (24% dans les deux cas), c'est-à-dire de carbone fixé par les plantes avant à la floraison (début de l'apport en carbone 13). Par la suite ce phénomène a été pris en compte pour les teneurs réelles en ^{13}C des grains de blé utilisés pour la production des métabolites secondaires.

I-1.2. Production de métabolites secondaires enrichis

Les grains de blé ou de maïs ainsi que la paille produite, enrichis aux isotopes stables, ont été transmis à l'équipe d'Olivier Puel (INRA, Toulouse¹). Ces supports solides ont alors été ensemencés par les souches de champignons dans les conditions optimisées de température et d'hygrométrie.

¹ INRA, UR66 Pharmacologie-Toxicologie, F-31931 Toulouse, France.

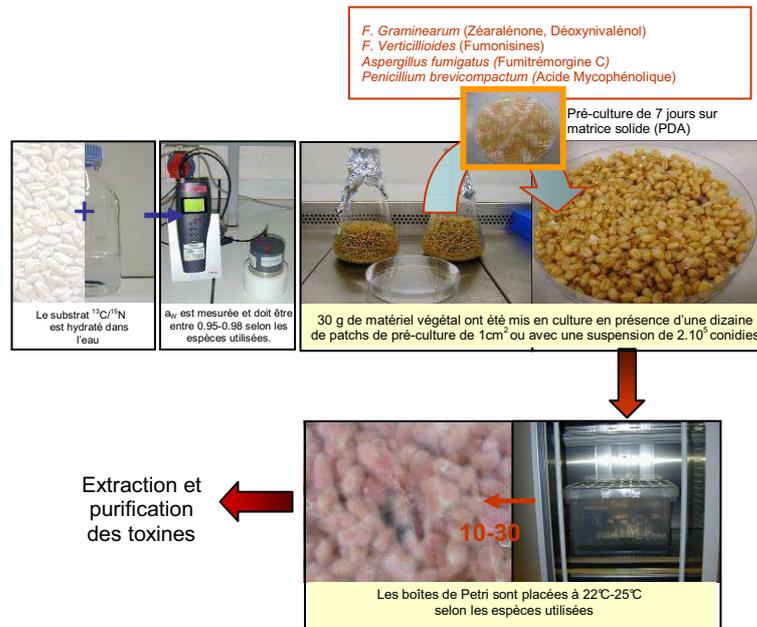


Figure IV 2 : Méthodologie suivie pour les productions de métabolites secondaires sur support solide

Les cultures sur grains ont permis de déterminer des conditions optimales de production des toxines suivantes: zéaralénone et acide mycophénolique, entre autres. Pour les deux toxines, les grains de blés sont hydratés afin d'obtenir une activité en eau a_w optimale de 0,98. De même, la température optimale de production de toxine a été déterminée à 25°C pour les deux toxines. Seules les durées de culture changent selon la toxine considérée, 27 à 30 jours pour la zéaralénone par *Fusarium graminearum*, 13 jours pour l'acide mycophénolique par *Penicillium brevicompactum*.

Tableau IV.2: Caractéristiques de l'acide mycophénolique et de la zéaralénone enrichis au carbone 13 (pic nominal à m/z 317 pour la ZEN et m/z 319 pour l'AMP en mode d'ionisation ESI négatif).

	Enrichissements	Quantité purifiée	Contribution à la masse nominale expérimentale (%)	Contribution à la masse nominale théorique (%)
Acide mycophénolique	37%±1%	28,1 mg	0	$4 \cdot 10^{-2}$
	76%±1%	27,44 mg	0	$5 \cdot 10^{-9}$
Zéaralénone	39%±1%	2,4 mg	0	$2 \cdot 10^{-2}$
	81%±1%	2,4 mg	0	10^{-11}

¹ L'activité de l'eau (symbole a_w pour *activity of water*) représente la pression de vapeur d'eau d'un produit humide sur la pression de vapeur saturante à la même température. Ce paramètre traduit les interactions de l'eau avec la matrice de l'aliment. L'activité en eau (a_w) est définie comme le rapport : $a_w = p/p_0$ p étant la pression partielle de vapeur d'eau et p_0 la pression de vapeur saturante de l'eau pure dans les mêmes conditions. L'activité en eau représente l'eau « libre » disponible dans le substrat pour la prolifération et la croissance du micro-organisme.

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.

I-2. Métabolisme par les mammifères

Nous avons pu utiliser ces composés enrichis à différents taux de ^{13}C pour étudier l'influence de ces enrichissements sur le métabolisme de la ZEN. Pour cela nous avons tout d'abord vérifié l'enrichissement des principaux métabolites formés de la ZEN, enrichie à différents taux de ^{13}C (1,08%, 10%, 39% et 81%), en présence de microsomes de foie de rat traité au phénobarbital (PB), composé inducteur d'un grand nombre d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques et en particulier des cytochromes P450s (*Cf.* Chapitre III). Les métabolites connus de la ZEN étant différents selon le pH, cette étude a été réalisée dans différentes conditions expérimentales :

- une première à pH 4,5 (formation majoritaire de l' α -zéaralénol – α -ZOL),
- une deuxième à pH 7,4 pour former le β -zéaralénol – β -ZOL et un hydroxy-zéaralénone – OH-ZEN ;
- et enfin une troisième à pH 7,4 pour former le dérivé glucuronide de la ZEN – ZEN-glu. Après avoir vérifié la formation de ces métabolites, un suivi temporel a été réalisé à partir de plusieurs proportions de ZEN naturelle et de ZEN enrichie au ^{13}C .

I-2.1. Déshydrogénases : formation des ZOLs

Afin de former les métabolites α/β -ZOL, des incubations de ZEN à pH 4,5 et 7,4 sont réalisées en suivant le protocole habituel (*cf.* chapitre VI Méthodologie expérimentale). Pour cela des solutions de ZEN à 10% (**20 μM**), 39% (**1,3 mM**) et 81% (**5,7 mM**) de ^{13}C ont été purifiées sur Sep-Pack, puis portées à sec et incubées à 50 μM dans les conditions standards avec des microsomes de rats traités au PB (1 μM de P450s) à pH 7,4 et 4,5 pendant 30 minutes.

Chaque incubation est analysée, par couplage HPLC-MS, dans les conditions standard de solvant et de gradient (voir conditions au chapitre VI). Les chromatogrammes présentant des pics caractéristiques de la ZEN et de ses métabolites sont alors sélectionnés et le spectre de masse en est extrait (Figure IV.3).

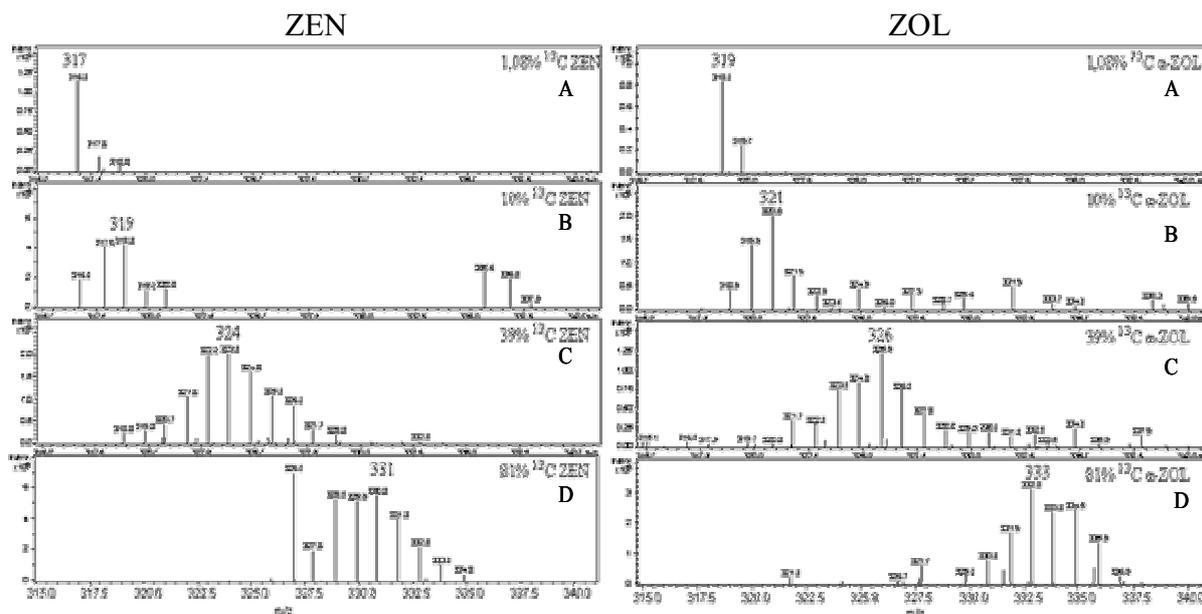


Figure IV.3 : Spectres de masse de ZEN naturelle (A), enrichie à 10%(B), 39% ou 81% de ^{13}C (gauche); spectres de masse de l' α -ZOL naturel (A), enrichi à 10% (B), 39% ou 81% de ^{13}C (droite).

Les massifs isotopiques observables sur les spectres de masse des Figure IV.3 et Figure IV.4 montrent que l'on retrouve bien un métabolite α -ZOL enrichi en ^{13}C pour tous les enrichissements initiaux en ^{13}C de la ZEN (naturel, 10, 39 et 81%). Par ailleurs, les calculs théoriques des enrichissements de ce métabolite formé, montrent que l' α -ZOL serait enrichi respectivement à 1, 10, 39 et 80% \pm 1% de ^{13}C , ce qui correspond globalement aux enrichissements initiaux de la ZEN, indiquant ainsi l'absence d'effet isotopique significatif.

Afin de confirmer cette absence d'effet isotopique sur la formation du ZOL, nous avons réalisé des incubations de ZEN avec des mélanges $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$. Les spectres présentés sur la Figure IV.4 sont tirés d'analyses d'incubations dans lesquelles de la ZEN naturelle et de la ZEN enrichie (10, 39 ou 81% de ^{13}C) ont été introduites en proportions variables (50% ZEN enrichie / 50% ZEN naturelle ou 20% ZEN enrichie / 80% ZEN naturelle). Cette expérience nous a permis d'étudier une compétition possible entre la ZEN enrichie et la ZEN naturelle. Par souci de clarté, nous ne présentons que l'exemple du mélange 50:50 de ZEN enrichie à 39% de ^{13}C :

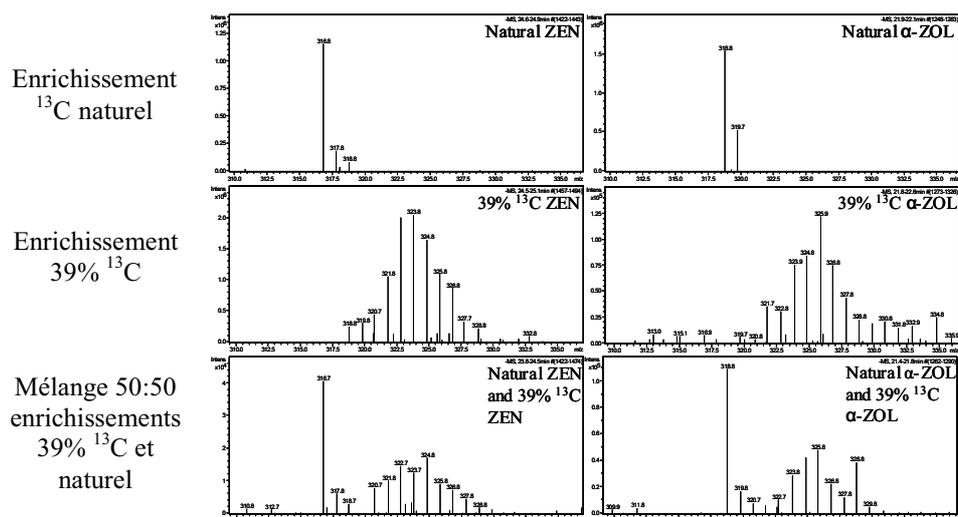


Figure IV.4 : Spectres de masse de ZEN (gauche); spectres de masse de l' α -ZOL produit (droite). Haut : abondance naturelle ; Milieu : enrichissement de 39% ^{13}C ; Bas : Mélange (50:50) de composés naturels et de composés enrichis à 39% de ^{13}C .

Les produits sont issus d'incubations de 30 minutes de ZEN à pH 4,5 avec des microsomes de rats PB. Plusieurs conditions initiales ont été utilisées : ZEN naturelle seule, ZEN enrichie à 39% ^{13}C seule et enfin mélange 50:50 de ZEN naturelle et de ZEN 39% ^{13}C . Des conditions identiques ont été appliquées avec des enrichissements de 10 et 81%- ^{13}C .

Les composés de masse m/z 317 (ZEN-H) et m/z 319 (α -ZOL-H) sont extraits des chromatogrammes et analysés par spectrométrie de masse afin de vérifier l'enrichissement du composé. Afin d'évaluer l'évolution de la formation du métabolite α -ZOL et de son enrichissement au cours du temps, nous avons suivi l'évolution d'un rapport entre les intensités des spectres de la ZEN restante d'une part et celles de l' α -ZOL formé d'autre part, au cours du temps d'incubation. Ce calcul consiste en l'estimation du rapport entre l'intensité du pic maximal du spectre de masse naturel et l'intensité du pic maximal du spectre de masse enrichi. En effet si l'on considère la ZEN naturelle, son pic maximal sera à m/z 317 en mode négatif alors que le pic maximal du massif de la ZEN enrichie à 39 % de ^{13}C sera à m/z 324. Par exemple, si l'on considère le mélange 50:50 39% ^{13}C ZEN/ ^{12}C ZEN à 20 minutes, le pic maximal de l' α -ZOL formé est à m/z 319 dans le massif naturel et le pic maximal dans le massif de l' α -ZOL enrichi en ^{13}C formé est à m/z 326. Ainsi, le rapport des deux intensités I_{319}/I_{326} est approximativement de 3,4.

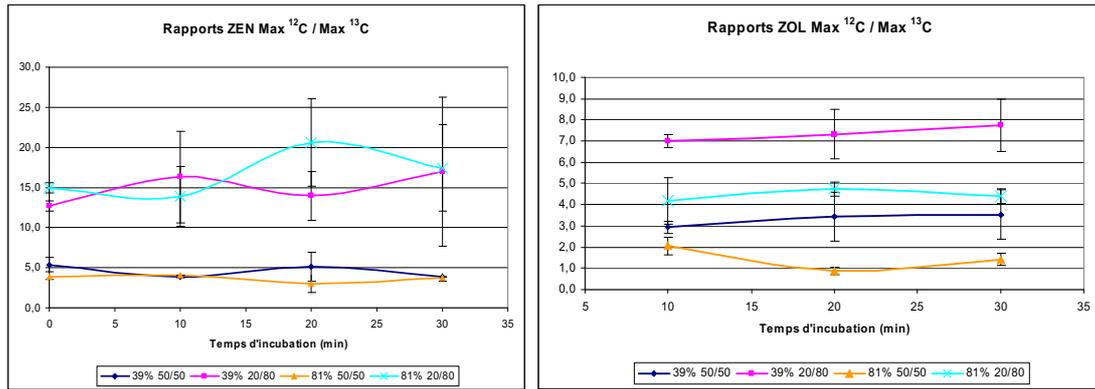


Figure IV.5 : Rapport entre l'intensité du pic maximal du composé naturel et l'intensité du pic maximal du massif isotopique du composé enrichi au ^{13}C (ZEN restante à gauche et ZOL formé à droite), en fonction du temps d'incubation et pour chaque mélange initial de ZEN enrichie avec de la ZEN naturelle (n=4).

A première vue, plusieurs tendances peuvent être déduites des graphiques des Figure IV.5, à pH 4,5 :

- L'évolution des rapports d'intensité de la ZEN restante est constante pour les mélanges 50:50 (que l'on utilise de la ZEN enrichie à 39% ou à 81% de ^{13}C), mais semble augmenter au cours du temps d'incubation pour les mélanges 20:80, ce qui laisserait penser que la ZEN ^{13}C , peu concentrée est métabolisée préférentiellement. Ainsi la Figure IV.5 gauche montre une évolution des rapports qui dépend plus des proportions de ZEN enrichie introduites initialement (50:50 et 20:80) que du taux d'enrichissement en ^{13}C (39 ou 81%).
- L'évolution des rapports d'intensité de l' α -ZOL $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ formé au cours du temps (Figure IV.5 droite) est moins claire car quatre courbes se distinguent, ce qui n'est pas en accord avec les rapports calculés pour la ZEN restante. En effet, le faible rapport $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ indiquerait une formation préférentielle du ^{13}C ZOL.

Une étude spécifique de la formation de l' α -ZOL en fonction du temps d'incubation pour les différents taux de ^{13}C initiaux nous montre une formation non linéaire de l' α -ZOL au cours du temps avec une ZEN naturelle contrairement aux enrichissements à 39 et 81% de ^{13}C (Figure IV.6).

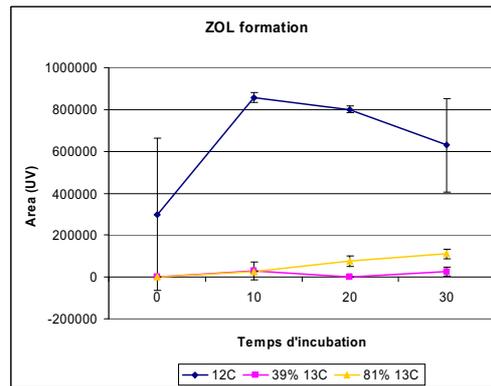


Figure IV.6 : Évolution de l'aire du pic d' α -ZOL (m/z 319 pour l' α -ZOL naturel, m/z 321-329 pour le 39%- ^{13}C α -ZOL, m/z 331-339 pour le 81%- ^{13}C α -ZOL) au cours du temps d'incubation selon différents taux de ^{13}C utilisés initialement pour la ZEN (n=4).

Le taux de métabolisme est bien plus important pour la ZEN naturelle : le taux de métabolisme de ZEN en α -ZOL au bout de 30 minutes d'incubation était de $13\% \pm 1\%$ pour l'enrichissement à 39% de ^{13}C et de $17\% \pm 3\%$ pour celui à 81% de ^{13}C contre $73\% \pm 5\%$ pour l'enrichissement naturel. Ceci nous laisse penser que l'évolution des rapports relatifs à l' α -ZOL formé est moins précise que celle de la ZEN restante qui reste le composé majoritaire dans la solution, *i.e.* dont les signaux spectraux sont les plus intenses. Les tendances des courbes de la Figure IV.5 de gauche (ZEN) devraient être plus informatives que celles de la figure de droite (ZOL).

De plus, au vu des écarts types des rapports calculés et à partir des allures des graphes obtenus, on ne peut dégager aucune conclusion précise sur l'évolution exacte des rapports des contributions au cours du temps, si ce n'est que ces derniers varient peu entre le début et la fin de l'expérience. C'est pourquoi nous avons calculé les moyennes temporelles des rapports pour chaque mélange $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (Figure IV.7) et ne trouvons pas de variations significatives.

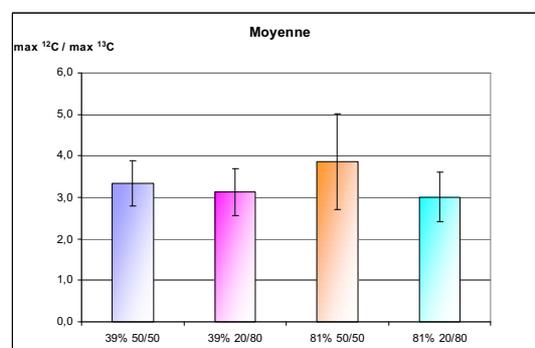


Figure IV.7 : Moyennes temporelles des rapports entre la contribution du pic maximal au massif du composé naturel et la contribution du pic maximal au massif du composé enrichi pour chacun des mélanges initiaux (n=16).

Enfin, il convient de préciser que nous n'avons pu nous affranchir d'une importante variabilité des mesures spectrales et que la reproductibilité des résultats varie selon les solutions enrichies que nous utilisons. L'allure de certains massifs isotopiques parfois déformés, peut expliquer également la difficulté que nous rencontrons à exploiter l'évolution des rapports $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ que nous avons suivis au cours du temps dans ces expériences. Le type de spectromètre de masse utilisé (trappe d'ions) pour toutes ces mesures pourrait être en partie à l'origine de ces difficultés (faible nombre d'ions dans la trappe).

Néanmoins, nous pouvons faire l'hypothèse que si des composés coproduits avec la ZEN et présents dans les solutions de ZEN enrichie, interviennent dans le métabolisme, ils n'empêchent pas complètement la formation de l' α -ZOL.

I-2.2. P450 : formation de l'OH-ZEN

Ici le protocole des incubations est le même que celui indiqué dans le paragraphe précédent hormis que nous nous plaçons à pH 7,4 pour former l'OH-ZEN. Nous reprenons donc les protocoles précédents mais en nous intéressant cette fois-ci aux spectres de masse du composé m/z 333.

Ainsi, si l'on retrouve bien que partiellement du β -ZOL enrichi dans les incubations de ZEN enrichie à différents taux de ^{13}C , nous ne retrouvons pas de l'OH-ZEN. En particulier, nous ne retrouvons significativement l'OH-ZEN que dans l'incubation de ZEN naturelle (Figure IV.8).

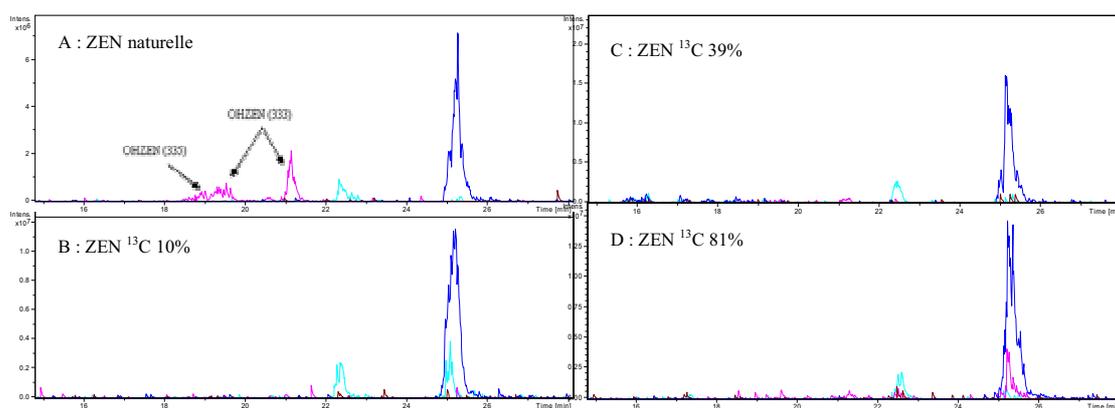


Figure IV.8 : Chromatogrammes des incubations de ZEN naturelle (A) et des mélanges 50%/50% ZEN naturelle/ ZEN enrichie à 10% (B), 39% (C) ou 81% (D) de ^{13}C .

Bleu : ZEN (m/z 317-335); azur : ZOLs ou ZAN (m/z 319-337); rose : OHZEN (m/z 333-351); brun : ZALs (m/z 321-339).

L'étude du métabolisme sur 30 minutes de la ZEN enrichie à partir de solutions purifiées a donné, quant à elle, les résultats suivants :

Tableau IV.3 : Formation et proportions d'OH-ZEN et de β -ZOL dans des incubations de ZEN à pH 7,4 à partir de différents mélanges ZEN ^{13}C /ZEN ^{12}C .

ZEN Enrichie	Proportions de ZEN ^{13}C	
	0,5	0,2
ZEN 10% ^{13}C	β -ZOL (9%)	β -ZOL (29%)
ZEN 39% ^{13}C	β -ZOL (4%)	β -ZOL (28%)
ZEN 81% ^{13}C	β -ZOL (21%)	OH-ZEN (4%) & β -ZOL (16%)

Les pourcentages sont exprimés en fonction de la quantité totale de métabolites formés et de ZEN restante. Ils sont calculés à partir des aires de signaux UV des composés.

De cela nous pouvons tirer plusieurs hypothèses :

1. Les composés coproduits contenus dans les solutions brutes de ZEN enrichie interfèrent avec l'action des cytochromes P450s responsables de la formation de l'OH-ZEN. En effet, seule l'incubation de ZEN naturelle (solution commerciale pure) permet de produire ce métabolite.
2. Il reste des traces de solvants utilisés dans les protocoles d'extraction/purification des solutions de ZEN enrichie qui inhiberaient le métabolisme de la ZEN en OH-ZEN. En effet, les solutions brutes de ZEN enrichie sont issues de l'extraction d'un milieu de culture solide fongique contenant un mélange complexe non identifié.
3. l'enrichissement au ^{13}C perturbe le métabolisme de la ZEN ^{12}C par les P450s responsables de la formation de l'OH-ZEN.

Afin de déterminer plus précisément le rôle inhibiteur de ces composés coproduits dans le métabolisme de la ZEN, nous avons étudié leurs effets en rajoutant une solution d'extrait brut de ZEN enrichie au ^{13}C à une concentration croissante : 50 μM de ZEN naturelle avec 0, 0,2, 1, 5, 10, 30 et 50 μM de ZEN 81% ^{13}C en présence de microsomes de rats PB à pH 4,5 et 7,4.

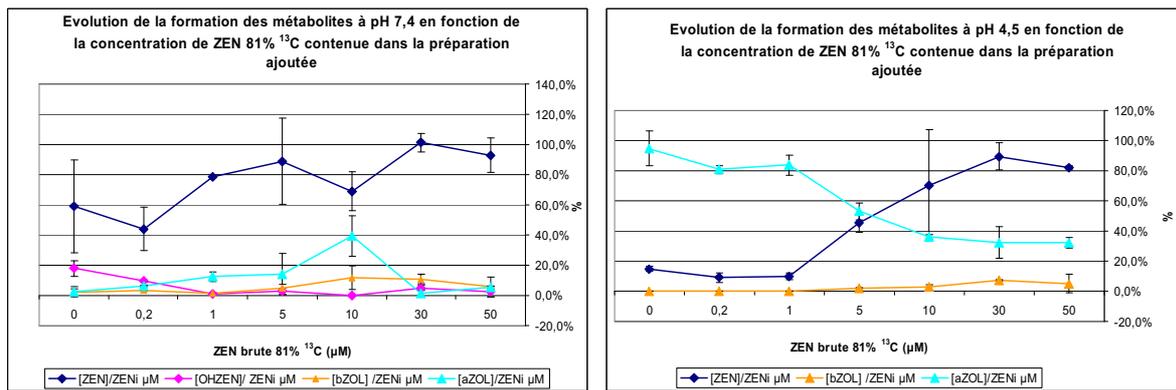


Figure IV.9 : Évolution du pourcentage des métabolites formés à pH 7,4 (gauche) et pH 4,5 (droite) en fonction de la concentration en ZEN ¹³C brute enrichie à 81% de ¹³C ; (n=4).

Comme nous pouvons le voir sur les graphiques de la Figure IV.9, plus la solution brute de ZEN enrichie au ¹³C est concentrée dans les incubations, moins le métabolisme de ZEN est efficace et ce, quel que soit le pH. Quant au β-ZOL, sa formation ne semble pas être affectée ni à pH 4,5 ni à pH 7,4 par les quantités croissantes de solutions brutes de ZEN enrichies au ¹³C. Par ailleurs, les rapports ¹²C/¹³C de β-ZOL suivent les mêmes évolutions que l'α-ZOL. Si le métabolite OH-ZEN se forme en quantité attendue à pH 7,4 à partir d'une solution naturelle de ZEN (environ 20% de métabolisme), sa formation est perturbée par l'ajout d'une solution brute de ZEN 81% ¹³C non purifiée.

Dans la mesure où l'ajout d'une quantité croissante de solution brute de ZEN enrichie au ¹³C perturbe le métabolisme de la ZEN à pH 4,5 comme à pH 7,4, nous pensons que des composés présents dans ces solutions brutes seraient à l'origine de telles modifications en agissant comme des inhibiteurs de certains systèmes enzymatiques.

Ces composés inconnus coproduits avec la ZEN auraient, par ailleurs, des caractéristiques polaires très voisines de celles de la ZEN puisque nous ne sommes pas parvenus à les séparer par différentes techniques de purification :

- une première purification par Sep-pack suivie d'une purification sur colonne d'immuno-affinité (CIA) spécifique à la ZEN (*cf* caractéristiques techniques et méthodologie détaillées au chapitre VI).
- une extraction de la ZEN avec du chloroforme CHCl₃ (Figure IV.10).

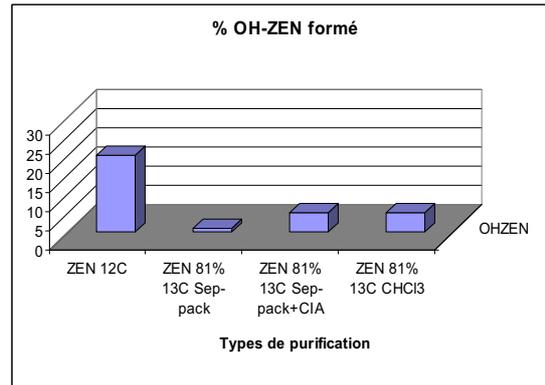


Figure IV.10 : Pourcentage de formation du métabolite OH-ZEN à partir de différentes solutions purifiées de ZEN 81% ¹³C.

Des incubations de ZEN ont été réalisées avec des microsomes de rats PB à pH 7,4 pendant 30 minutes. Plusieurs solutions de ZEN ont été utilisées : ZEN naturelle, ZEN 81% ¹³C purifiée sur Sep-Pack, ZEN 81% ¹³C purifiée sur Sep-Pack puis sur colonne d'immuno-affinité (CIA) ; ZEN 81% ¹³C extraite au chloroforme (CHCl₃). Les taux de formation de l'OH-ZEN ont été mesurés par HPLC-UV à 280 nm.

Malgré une forte perturbation du métabolisme de la ZEN à pH 7,4 qui a rendu très difficile la formation du métabolite OH-ZEN enrichi au ¹³C, nous continuons de penser qu'un composé co-élué avec la ZEN serait à l'origine de ces modifications car :

- nous avons fini par obtenir l'OH-ZEN 81% ¹³C comme le montre le spectre de masse ci-dessous de la Figure IV.11 (bas) ;
- la présence d'une faible quantité de solution brute de ZEN ¹³C (0,1 μM) suffit à perturber le métabolisme de la ZEN naturelle (Figure IV.9).

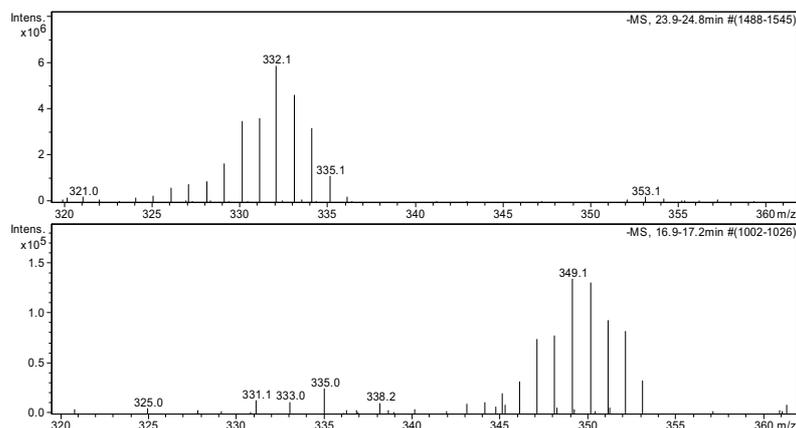


Figure IV.11 : Spectres de masse de ZEN 81%-¹³C (haut), OH-ZEN 81%-¹³C.

I-2.3. Acide glucuronique

Enfin, nous avons étudié la formation d'un dérivé glucuronidé de la ZEN. La réaction de glucuro-conjugaison consiste simplement en une réaction de substitution nucléophile entre l'alcool de l'acide glucuronique et une fonction alcool de la ZEN. Il s'agit donc d'une

formation d'éther qui pourrait dépendre d'un effet isotopique. Néanmoins la glucuronidation se faisant sur un oxygène, il s'agirait d'un effet isotopique indirect du ^{13}C .

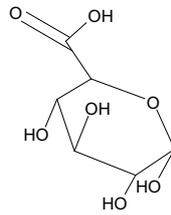


Figure IV.12 : Acide glucuronique ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$; $M=194$ g/mol)

L'utilisation de ZEN enrichie au ^{13}C nous a permis d'identifier facilement le dérivé enrichi ZEN-glu par spectrométrie de masse. Il est important de préciser que seul le résidu de ZEN est enrichi au ^{13}C contrairement au résidu d'acide glucuronique $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$ qui a seulement un enrichissement ^{13}C naturel (1,08%). Dans le spectre de masse de fragmentation du « 81% ^{13}C » ZEN-glu, nous pouvons constater que nous retrouvons le résidu de 81% ^{13}C ZEN (maximum m/z 333 en mode d'ionisation négative) et le résidu naturel de l'acide glucuronique déshydraté $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (m/z 175) (Figure IV.13, droite).

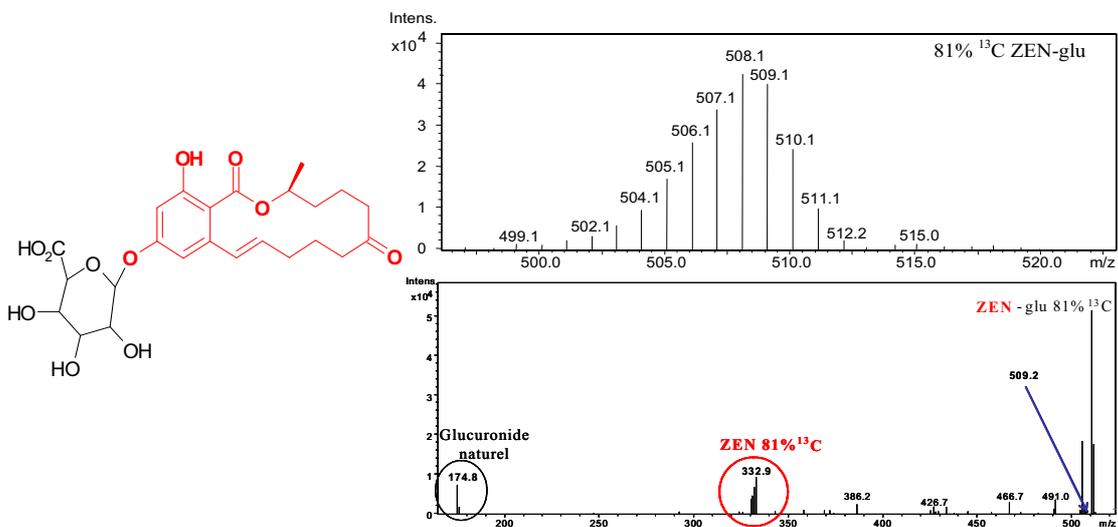


Figure IV.13 : ZEN glucuronide (gauche) ; Spectres de masse MS (droite haut) et MS^2 (droite bas) du dérivé ZEN-glucuronide enrichi à 81% de ^{13}C .

Le glucuronide de la ZEN 81% ^{13}C (rouge) a été formé à partir du sucre naturel $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$ (noir). La fragmentation MS^2 du pic m/z 509 du massif isotopique du glucuronide ainsi formé, a permis de retrouver le massif isotopique de la ZEN 81% ^{13}C et le spectre du résidu naturel de l'acide glucuronique déshydraté $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (m/z 175).

1 mM de ZEN (2% final DMSO) a été incubé avec les microsomes hépatiques de rats PB dans une solution de tampon phosphate KH_2PO_4 à pH 7,4 (0,1 M) dans les conditions expérimentales décrites au chapitre VI. L'incubation a été réalisée à $+37^\circ\text{C}$ sous agitation

pendant 3 heures. Une incubation témoin a été réalisée dans les mêmes conditions sans UDPGA. Des prélèvements ont été effectués à 0, 1 heure et deux heures puis placés dans la glace et dilués avec une solution de méthanol/acide formique (100 :1). Les protéines précipitées ont été séparées par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes. Les surnageants ont été analysés par HPLC-UV/MS et MS/MS (Figure IV.14).

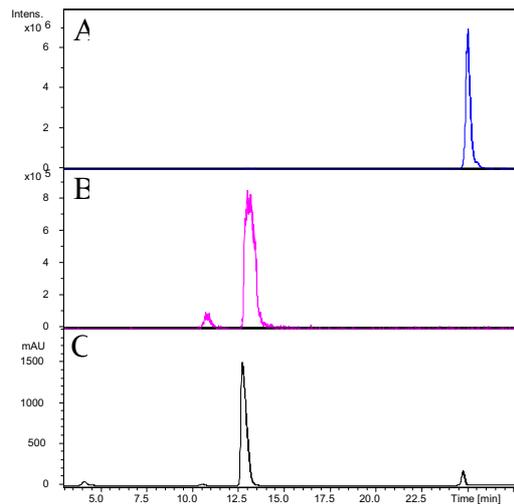


Figure IV.14 : Chromatogrammes des incubations de ZEN naturelle avec de l'UDPGA et des microsomes de rats PB au bout de 2 heures.

(A) bleu : ZEN (m/z 317); (B) rose : ZEN-glu (m/z 493); (C) noir : UV (280 nm).

Ici encore, pour évaluer l'impact de l'enrichissement sur la formation du métabolite (ici ZEN-glucuronide), nous avons suivi le même rapport entre les intensités maximales des spectres naturels et enrichis de la ZEN restante et de la ZEN-glu formée au cours du temps d'incubation. Il s'agit en fait de mesurer si un des deux métabolites (enrichi et naturel) se forme préférentiellement.

Par exemple, dans un mélange initial contenant 50% de ZEN enrichie à 81% de ^{13}C et 50% de ZEN naturelle, après 2 heures d'incubation, le pic maximal de la ZEN-glu formée naturelle est à m/z 494, et le pic maximal du massif isotopique de la ZEN-glu ^{13}C formée est à m/z 509. La moyenne des deux intensités I_{494}/I_{509} est approximativement de 6,7 (Figure IV.15 droite).

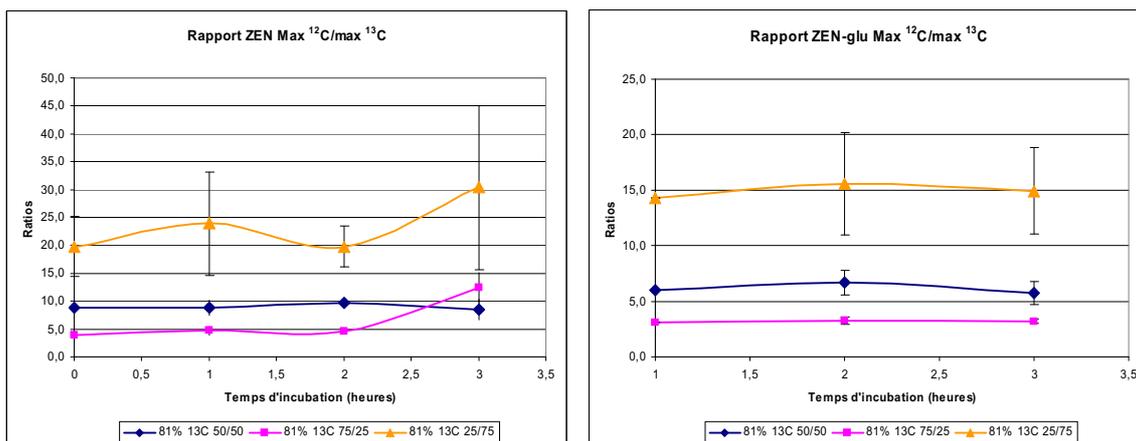


Figure IV.15 : Rapport entre l'intensité du pic maximal du composé naturel et l'intensité du pic maximal du massif isotopique du composé enrichi au ¹³C (ZEN restante à gauche et ZEN-glu formée à droite), en fonction du temps d'incubation et pour chaque mélange initial de ZEN enrichie avec de la ZEN naturelle (n=2).

Le taux de métabolisme de la ZEN-glu naturelle et enrichie est de l'ordre de $3\% \pm 1\%$ au bout de 3 heures d'incubation.

On constate sur les graphiques de la Figure IV.15 que les rapports varient peu au cours du temps quel que soit le mélange initial ¹²C/¹³C. Ces rapports respectent aussi les proportions initiales de ZEN enrichie introduite. Néanmoins les écarts types restent trop importants comme dans les autres réactions métaboliques, pour pouvoir accorder beaucoup de crédit aux valeurs absolues de ces rapports. Plus que les valeurs numériques, nous pouvons nous intéresser davantage à l'évolution de ces rapports qui varient peu au cours du temps d'incubation, signifiant que l'enrichissement au ¹³C, même important (ici 81%), influence peu la formation du dérivé glucuronidé de la ZEN.

Le même protocole a été appliqué à l'acide mycophénolique : le suivi temporel du dérivé glucuronidé a permis de calculer les mêmes rapports ¹²C/¹³C et n'a pas montré de différence de comportement par rapport à la ZEN.

Encore une fois ces résultats sont à considérer avec précaution au vu des problèmes analytiques évoqués précédemment.

I-2.4. Conclusions

En première approche, les déshydrogénases ne semblent pas faire de distinction significative entre la ZEN naturelle et la ZEN enrichie au ¹³C. En revanche, les composés coproduits

présents dans les bruts de ZEN enrichie pourraient intervenir et influencer la formation du métabolite α -ZOL à pH 4,5.

A pH 7,4, voyant une formation d'OH-ZEN limitée (enrichi et naturel à partir de la ZEN présente dans les incubations) nous sommes tentés de penser que ces coproduits présents dans les bruts de ZEN enrichie auraient un effet inhibiteur sur les systèmes enzymatiques impliqués dans la formation de l'OH-ZEN (cytochromes P450s). Quant à la glucuronidation de la ZEN, elle ne semble pas affectée par l'enrichissement en ^{13}C puisque nous n'avons rencontré aucune difficulté à former le glucuronide enrichi au ^{13}C à partir de solutions de ZEN enrichies à différents taux de ^{13}C . Ces résultats ouvrent néanmoins des perspectives d'études des effets des composés coproduits avec la ZEN sur les activités enzymatiques lors d'expositions de mammifères. Ceci dans le but d'étudier plus précisément les effets isotopiques.

I-3. Transport

Il s'agit ici d'évaluer le transport à travers une membrane biologique de mammifère d'un mélange brut de ZEN ^{13}C avec d'autres composés de nature connue ou non (DON par exemple), enrichis ou non par des isotopes stables. Nous recherchons ici à mesurer l'influence d'un extrait brut enrichi au ^{13}C sur le transport à travers une paroi cellulaire. Il ne s'agit donc pas seulement de mesurer un potentiel effet isotopique mais d'étudier l'influence globale liée au mélange complexe dont est constitué un extrait brut enrichi.

Pour cela des séries d'expériences de transport à travers une membrane poreuse sur laquelle des cellules épithéliales de type Caco 2¹ (choisies comme modèle de l'épithélium intestinal humain (Pinto *et al.*, 1983)) sont cultivées et polarisées. Elles forment alors des jonctions intercellulaires très jointives. Ces expériences ont été réalisées à l'École Vétérinaire de Lyon, dans l'équipe de Sylvaine Lecoer (INRA²).

¹ Lignée cellulaire d'un carcinome du colon humain.

² UMR 1233 INRA ENVL ISARA - Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques, 69280, Marcy l'Etoile.

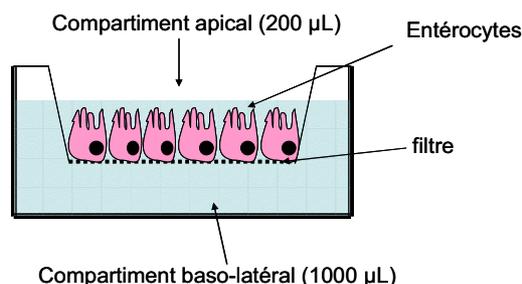


Figure IV.16 : Schéma d'un puits utilisé pour la mesure du transport muni d'un filtre sur lequel est cultivée une couche de cellules épithéliales jointives polarisées.

I-3.1. Matériel et méthodes

Deux solutions brutes de ZEN ^{13}C 10% ont été sélectionnées parmi une série de bruts, la solution notée 1 et la solution notée 15¹ :

Tableau IV.4 : Dosage de ZEN (naturelle ou 10%- ^{13}C) dans plusieurs extraits de culture de *Fusarium graminearum* (souche G5G7 ou F6G10) sur différents supports (blé ou riz, grain ou paille) enrichis ou naturels.

N	Type	Souche	Poids culture	Vol (mL) concentré	Détection	[ZEN] (μM)
1	Blé ^{13}C (culture 1)	G5G7	42,6 g	16	ZEN (DON)	210
2	Blé ^{13}C (culture 2)	G5G7	42,2 g	9	ZEN (DON?)	0
3	Blé ^{12}C (1)	G5G7	47,76 g	28	ZEN	0
4	Blé ^{12}C (2)	G5G7	43,48 g	25	ZEN	0
5	Paille de blé ^{12}C (2)	G5G7	32,39 g	20	ZEN	0
6	Paille de blé ^{13}C (2)	G5G7	25,8 g	12	ZEN	0
7	Paille de riz ^{12}C (2)	G5G7	37,25 g	20	ZEN	14
8	Paille de riz ^{13}C (2)	G5G7	30,15 g	15	ZEN	2
9	Blé ^{13}C Culture 1 (EXT)	F6G10	39 g	5	DON (ZEN)	0
10	Blé ^{13}C Culture 2 (EXT)	F6G10	42,1 g	20	DON (ZEN)	0
12	Paille de blé ^{12}C (1)	G5G7	27,75 g	17	ZEN	0
13	Paille de blé ^{13}C (1)	G5G7	24,3 g	17	ZEN	0
14	Paille de riz ^{12}C (1)	G5G7	34,3 g	23	ZEN	20
15	Paille de riz ^{13}C (1)	G5G7	35,4 g	23	ZEN	20
16	Blé ^{13}C Culture 2 (INT)	F6G10	39,4 g	20	DON (ZEN)	0
17	Blé ^{13}C Culture 1 (INT)	F6G10	45,2 g	11	DON (ZEN)	0
11	Rafle maïs (4,8% ^{13}C , 10% ^{15}N)			20	FB1, 2, 3	
18	Tige maïs (4,8% ^{13}C , 10% ^{15}N)			17	FB1, 2, 3	

Les concentrations ont été évaluées par analyse des solutions brutes en HPLC-MS. Certaines souches (F6G10) ont été choisies pour leur capacité à produire à la fois de la ZEN et du déoxynivalénol (DON), autre mycotoxine connue. Plusieurs types de biomasses de blé ou de riz enrichies ou naturelles ont été testées (tiges de blé, notées « paille », grains de blé, notés « blé ») pour les supports de cultures des micro-organismes producteurs de ZEN et/ou de DON. De même, plusieurs types de biomasses de maïs enrichies ou naturelles ont été utilisées (rafle ou tige) pour les supports de cultures des micro-organismes producteurs de fumonisines (FB1, 2, 3). Les espèces notées entre parenthèses sont des espèces minoritaires dans la solution.

¹ Cette série a été initialement produite afin d'étudier la possibilité d'obtenir de la ZEN à partir de différents types de biomasse (projet valorisation de la biomasse dans le cadre d'un projet ANR).

Les chromatogrammes des deux bruts montrent que les deux solutions contiennent une quantité importante d'autres composés éluant entre 7 et 19 minutes en mêmes proportions, mais avec une plus forte concentration de ZEN dans la solution n°1 (Figure IV.17).

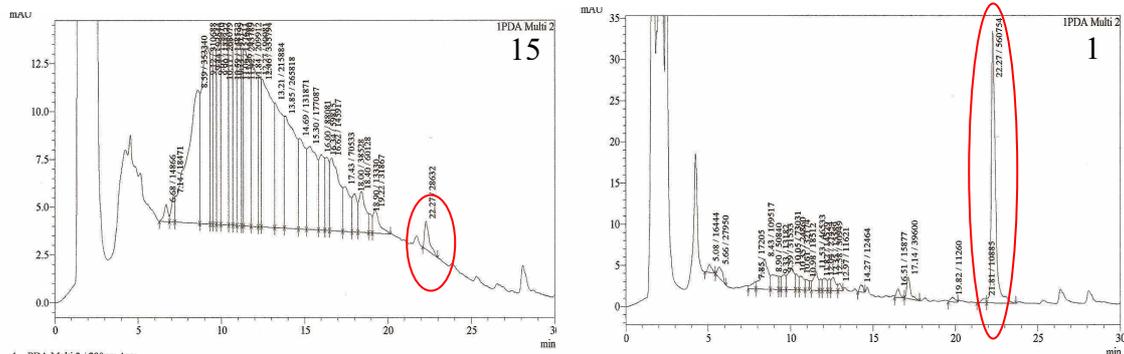


Figure IV.17 : Chromatogrammes des solutions brutes n°1 (droite) et n°15 (gauche) enrichies à 10% de ^{13}C .

Encore une fois, l'influence des composés coproduits est évaluée et c'est pourquoi, quand la concentration en ZEN dans les bruts le permet (n'est pas trop grande, *i.e.* pour la solution 15), plusieurs concentrations en « impuretés » sont testées. Pour cela nous nous sommes placés à concentration totale de ZEN constante ($10\ \mu\text{M}$). Ceci est possible en ajustant la quantité de ZEN totale avec une solution de ZEN commerciale.

Cinq plaques de culture de 24 puits sur insert ont été réalisées ; le volume apical introduit est de $200\ \mu\text{L}$ et le volume basal est de $1000\ \mu\text{L}$ d'HBSS¹ (milieu de transport riche en glucose : $1\ \text{g/L}$). Chaque condition est répliquée trois fois ($n = 3$) et l'application des solutions se fait toujours sur le pôle apical de l'insert. Le détail des conditions expérimentales est précisé dans le chapitre VI.

Succinctement, le transport de la ZEN ^{12}C (commerciale) seule (de $0,02$ à $10\ \mu\text{M}$) a été étudié sur une première plaque et comparé à celui des solutions de ZEN ^{13}C brutes 1 et 15 (de $0,01$ à $1\ \mu\text{M}$ et de $0,01$ à $2\ \mu\text{M}$ respectivement) sur deux autres plaques. Nous nous sommes également intéressés au rôle des coproduits dans le transport de la ZEN et pour cela nous avons étudié sur une quatrième plaque, le transport d'une solution de concentration constante en ZEN de $10\ \mu\text{M}$ contenant une proportion croissante de la solution de ZEN ^{13}C brute 15 (de 0 à $2\ \mu\text{M}$). Enfin, sur une dernière plaque une solution de blé témoin ne contenant pas de ZEN a été utilisée avec ou sans ajout de $10\ \mu\text{M}$ de ZEN ^{12}C .

¹ HBSS = Hank's Balanced Salt Solution

L'exposition a été réalisée à 37°C en étuve, pendant 3 h, avec des cellules dont le nombre de passages était de 27. A la fin de l'exposition, l'intégralité des volumes apicaux et basaux a été prélevée. Les puits ont alors été lavés avec une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline), sans MgCl₂ ni CaCl₂. Le tapis cellulaire a été dissous dans 50 µL de Triton®-X (détergent visant à lyser les membranes cellulaires) et récupéré pour analyse.

I-3.2. Cytotoxicité

Avant d'entamer les expériences de transport en elles mêmes, il a été nécessaire d'évaluer la cytotoxicité de la ZEN sur les cellules Caco 2 pendant 6 heures. En effet, la ZEN est connue pour être génotoxique (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1995; Lioi *et al.*, 2004), pour induire la peroxydation des lipides et la mort cellulaire et enfin pour inhiber la synthèse des protéines et de l'ADN (Abid-Essefi *et al.*, 2004). Son IC₅₀ a été mesurée pour l'inhibition de la synthèse des protéines et celle de l'ADN à 19 et 20 µM respectivement (Kouadio *et al.*, 2005).

Ce travail a été réalisé par Jonathan Tep¹ par le test du MTT² (*in vitro* toxicology assay kit MTT based, Sigma) : ce test mesure l'activité des déshydrogénases mitochondriales des cellules viables en suivant la formation de cristaux de bleu de formazan à partir d'une solution de tétrazolium incolore par mesure de l'absorbance à 590 nm.

Des travaux précédents ont montré que l'effet de la ZEN sur la viabilité des cellules se caractérisait par une IC₅₀ de 25 µM par le test MTT et 15 µM par le test du rouge neutre³ (Kouadio *et al.*, 2005).

Le protocole d'étude de toxicité tient compte de la volonté d'évaluer également le rôle des coproduits dans le transport de la ZEN ¹³C. C'est pourquoi la solution introduite dans les puits de culture est à concentration croissante en coproduits et à concentration constante en ZEN pour le brut 15 (le brut 1 étant déjà trop concentré en ZEN). Trois plaques de culture de 96 puits ont été réalisées. Sur la première plaque la cytotoxicité de la solution de ZEN ¹³C brute 1 a été étudiée : étant la solution la plus concentrée, en augmentant la concentration en coproduits, on augmente aussi la concentration de ZEN. C'est pourquoi plusieurs concentrations de ZEN ont été testées (de 0,02 à 1 µM). Au contraire, sur la deuxième plaque où la cytotoxicité de la solution de ZEN ¹³C brute 15 a été testée, si la concentration en ZEN

¹ UMR 1233 INRA ENVL ISARA - Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques.

² Thiazolyl blue tetrazolium bromide.

³ Seules les cellules viables accumulent la teinte rouge dans leur membrane cellulaire : après une lyse de ces membranes, on peut mesurer l'absorbance qui sera proportionnelle au nombre de cellules viables.

totale reste constante égale à 10 μM la concentration en solution brute est croissante de 0,02 à 1 μM . Enfin la dernière plaque a été consacrée à l'étude de la cytotoxicité d'une solution de ZEN naturelle de concentration croissante (de 0,02 à 1 μM).

Les cellules utilisées sont des cellules Caco 2 J4, au 28^e passage et sont exposées aux conditions décrites ci-dessus pendant 6 heures.

Afin de déterminer les valeurs de cytotoxicité des solutions brutes 1 et 15, une valeur différente de moins de 5% est considérée comme non significativement différente de la valeur mesurée sur les plaques contrôle (l'activité contrôle des déshydrogénases mitochondriales).

Il semble qu'au-delà de 0,2 μM de ZEN pour les 2 solutions brutes 1 et 15, des effets toxiques significatifs soient observés (Figure IV.18).

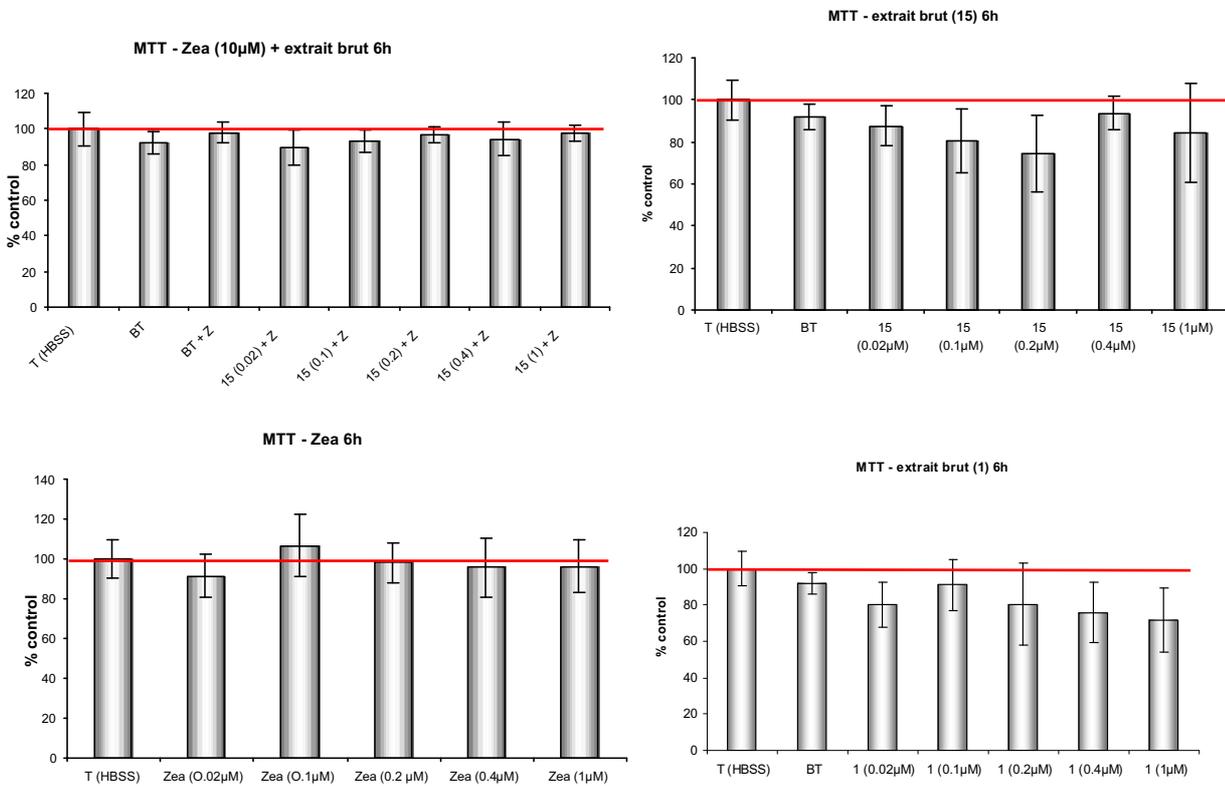


Figure IV.18 : Mélange à ZEN constante (10 μM) de la solution brute 15 et de ZEN ¹²C commerciale (haut gauche); solution brute 15 seule (haut droite) ; ZEN ¹²C commerciale (bas gauche) ; solution brute 1 seule (bas droite).

T = Témoin HBSS¹ ; BT = Blé témoin ; BT+Z = Blé témoin + ZEN ¹²C (10 μM), n=6.

¹ HBSS : milieu de transport à 10 mM de glucose, pH 7,4.

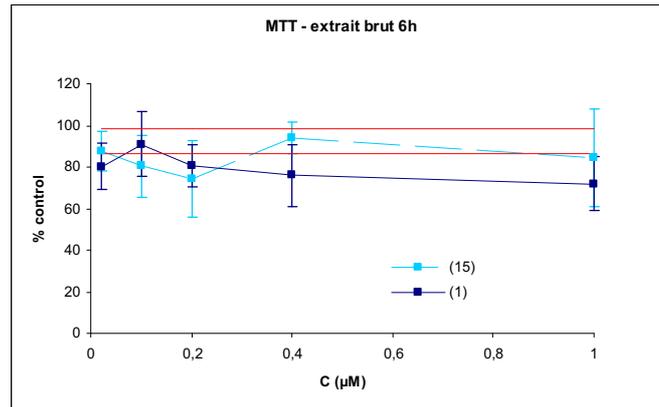


Figure IV.19 : Activité déshydrogénase des solutions brutes 1 (200 µM) et 15 (20 µM) entre 0 et 1 µM de ZEN.

Le pourcentage de l'activité des déshydrogénases mitochondriales (mesurée par l'absorbance à 590 nm du bleu de formazan) par rapport à l'activité contrôle des déshydrogénases mitochondriales a été représenté en fonction de la concentration de ZEN totale des solutions brutes 1 et 15, rapportée en abscisses (C).

Les résultats montrent une toxicité des cellules à la ZEN plus importante que celle qu'annonçait la littérature : 1 et 2 µM pour les solutions brutes 1 et 15, respectivement, contre 15 ou 25 µM selon le test utilisé pour la ZEN naturelle d'origine commerciale. Ceci nous confirme le rôle que jouent les composés coproduits présents dans les solutions brutes et l'importance d'étudier leurs effets sur le transport de la ZEN.

I-3.3. Résultats des expériences de transport

Les extraits de chaque compartiment (apical, basal et cellulaire) sont tout d'abord analysés par HPLC (détection UV à 280 nm). Néanmoins, les concentrations de ZEN allant jusqu'à 0,01 µM, une étape de purification-concentration s'est avérée indispensable.

Pour cela l'ensemble des extraits a été purifié sur plaques Discovery® SPE-96 well plates (Supelco, PA, USA), puis concentré en portant à sec l'éluat. La solution apicale est reprise dans 50 µL d'eau:acétonitrile 50:50 (volume initial : 200 µL), la solution basale est reprise dans 150 µL d'eau:acétonitrile 50:50 (volume initial : 1000 µL) et la solution cellulaire est reprise dans 50 µL d'eau:acétonitrile 50:50 (volume initial : 200 µL). Ces solutions concentrées sont alors analysées par couplage HPLC-MS.

L'exploitation des résultats a été délicate car certaines solutions, trop peu concentrées, sont à la limite de détection et un dosage de la ZEN dans ces compartiments n'était pas raisonnable, malgré les étapes de concentration (ceci est particulièrement vrai pour le compartiment cellulaire). Néanmoins, dès 1 µM, nous avons pu voir l'effet des composés coproduits sur le passage de la ZEN du compartiment apical au compartiment basal :

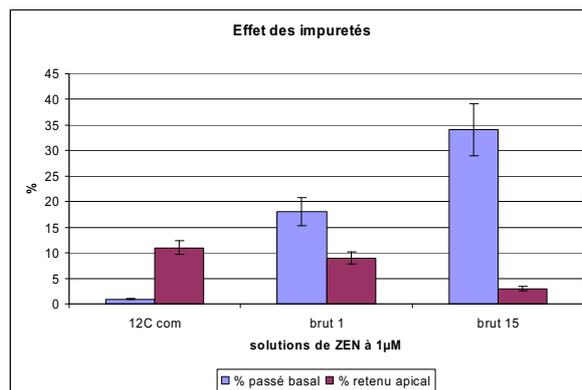


Figure IV.20 : Influence des composés coproduits dans le transport de la ZEN à 1 µM sur Caco2.

Le pourcentage de ZEN passée dans le compartiment basal ou retenue dans le compartiment apical par rapport à la quantité initiale de ZEN appliquée (1 µM ici) au début de l'exposition des cellules Caco2 a été reporté pour la ZEN ¹²C commerciale et pour les solutions de ZEN ¹³C brutes 1 et 15 (en abscisses). Le reliquat cellulaire n'a pas été reporté dans la mesure où les quantités retrouvées étaient trop faibles.

Toutes les mesures ont été faites par couplage HPLC-MS.

D'après le diagramme ci-dessus (Figure IV.20), nous pouvons constater que les composés coproduits influencent le passage de la ZEN du compartiment apical au compartiment basal. Plus précisément, plus la solution est chargée en impuretés (la solution de brut n°1 est plus concentrée en ZEN que la solution n° 15, mais contient moins de composés coproduits), plus le transport est efficace, ce qui semble plutôt inattendu. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- la ZEN s'associerait avec d'autres composés qui la rendraient plus hydrosoluble, facilitant son passage à travers le tapis cellulaire ;
- la modification du tapis cellulaire pourrait favoriser le passage para-cellulaire ;
- les composés coproduits seraient responsables d'une augmentation de la cytotoxicité et donc du passage de la ZEN, mais cette dernière hypothèse est contestable puisque le test au MTT aurait été plus marqué et que nous nous sommes placés à des concentrations en deçà des concentrations cytotoxiques déterminées.

Rappelons que les concentrations inférieures à 1 µM sont difficilement exploitables avec le spectromètre utilisé car le signal est trop faible pour une étude quantitative. Nous nous trouvons confrontés à un problème de doses : à trop fortes concentrations la ZEN devient toxique pour le tapis cellulaire et à trop faibles concentrations, on atteint les limites de quantification.

I-3.4. Conclusions

Les produits présents dans les solutions de ZEN brutes enrichies en ^{13}C interfèrent sur le transport de la ZEN. Néanmoins, nous ne pouvons tirer de conclusions précises de cette expérience, compte tenu des difficultés que nous avons rencontrées pour l'aspect quantitatif.

L'objectif était de mesurer l'effet des composés coproduits sur le transport de la ZEN enrichie brute et non pure. Nous pouvons supposer que les composés coproduits avec la ZEN influencent une partie de sa réactivité et de son transport. Ces résultats qualitatifs sont en accord avec les effets que nous avons pu constater sur le métabolisme de la ZEN à pH 7,4 pour la formation de son métabolite hydroxylé OH-ZEN.

I-4. Discussion et conclusion sur les traçages isotopiques expérimentaux

Les perturbations du métabolisme et du transport de la ZEN laissent supposer la présence de composés coproduits, ayant un temps de rétention proche de celui de la ZEN (absorption UV à 280 nm) et possédant une forte activité inhibitrice P450. Malgré des étapes cruciales de purification sur colonnes Sep-Pack puis sur colonne d'immuno-affinité (ou par HPLC semi-préparative) avant les incubations, d'autres composés que la ZEN sont susceptibles d'être présents dans la phase éluée à l'ACN. Pour cela ce ou ces composés doivent avoir un temps de rétention et une polarité très proche de ceux de la ZEN. Une hypothèse qui peut être avancée serait la présence de ZEN structurellement modifiée (stéréochimie différente de la stéréochimie de la ZEN naturelle) dans les solutions brutes et purifiées et ayant un temps de rétention très proche de celui de la ZEN naturelle. Ce composé, voisin de la ZEN naturelle, pourrait inhiber l'activité enzymatique des CYP intervenant dans le métabolisme de la ZEN naturelle. Cela expliquerait la modification du métabolisme de cette dernière en présence des solutions contenant de la ZEN enrichie. L'analyse des spectres RMN de la ZEN 10%- ^{13}C purifiée par HPLC semi-préparative montre la présence de signaux n'appartenant pas au spectre de la ZEN (Figure V.21).

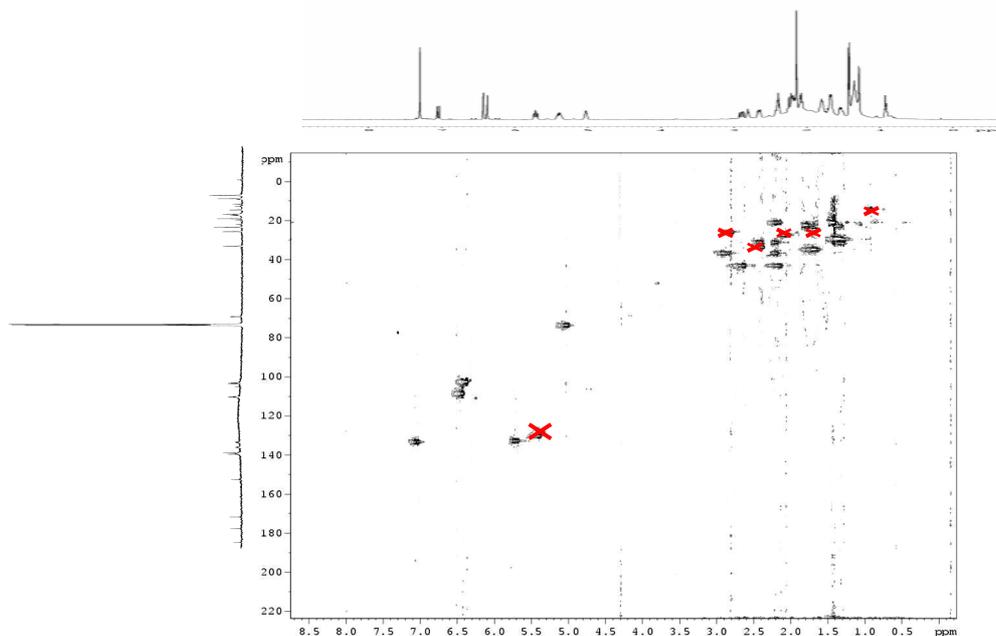


Figure V.21 : Corrélation ^1H - ^{13}C de 10%- ^{13}C ZEN enrichie et purifiée sur HPLC-semi-préparative.

Les croix en rouges appartiennent au spectre d'une impureté.

II. Réactivité théorique

Parallèlement à l'étude expérimentale de l'effet isotopique du ^{13}C sur le métabolisme et sur le transport de la ZEN, nous souhaitons ici estimer, de façon théorique, l'influence de l'enrichissement au ^{13}C sur la réactivité chimique de la ZEN. Nous avons pour cela, considéré une réaction (simplifiée) d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN lors du cycle catalytique faisant intervenir du dioxygène et des enzymes du métabolisme (P540s).

II-1. Approche thermodynamique

Pour mener à bien cette étude, nous avons laissé de côté l'aspect cinétique pour se focaliser uniquement sur l'aspect thermodynamique de la réaction d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN. En effet, la considération de l'aspect cinétique nécessiterait l'estimation de barrières d'énergie le long de chemins réactionnels complexes auxquels nous ne nous sommes pas intéressés.

Nous nous sommes donc limités à l'étude de l'influence de la substitution isotopique sur le potentiel thermodynamique F (ou plutôt sur sa variation lors de la réaction). Ainsi la grandeur thermodynamique que nous avons choisie et que nous allons justifier dans un instant, est l'énergie libre F (sa variation ΔF). Nous avons alors décomposé cette variation selon :

$$\Delta F(N,V,T) = \Delta F_{\text{GP}} + \Delta F_{\text{g} \rightarrow \text{m}} \text{ (Berashevich et Chakraborty, 2007), où :}$$

- $\Delta F_{GP}(N,V,T)$ est le bilan thermodynamique de la réaction se déroulant en phase gazeuse, les molécules étant considérées comme isolées,
- et $\Delta F_{g \rightarrow m}(N,V,T)$ est le terme à rajouter lorsque la réaction se déroule dans un milieu réel, par exemple un solvant. Ce dernier terme est bien sûr très difficile à modéliser et coûteux en temps de calcul. Il dépend en particulier du milieu dans lequel se trouve la ZEN (resp. OH-ZEN) et une étude exhaustive ne saurait en être faite.

Dans ce travail, nous avons d'abord cherché à modéliser le premier terme ΔF_{gaz} (partie II-2) puis nous avons essayé d'apporter quelques éléments de réponse concernant le second terme sur un exemple (partie II-3).

Pour simplifier le problème et dans le cadre d'une première approche de la réactivité théorique de la ZEN, nous avons volontairement mis de côté le rôle du catalyseur joué par les cytochromes P450s responsables de la formation de l'OH-ZEN. La réaction d'oxydo-réduction envisagée est :



Nous nous sommes alors intéressés aux états final et initial de cette réaction d'oxydation où le bilan d'énergie libre $\Delta F(T)$, associé à la réaction est :

$$\Delta F(N,V,T) = F(N_{OH-ZEN},V,T) - F(N_{ZEN},V,T) - F(N/2 \text{ O}_2,V,T) \quad (1)$$

Comme nous allons le voir, la substitution par du ^{13}C peut influencer sur la stabilité thermodynamique **par le biais des modes de vibration**. Nous avons donc été amenés à rechercher les modes de vibration du réactif (ZEN) et du produit (OH-ZEN). La meilleure méthode pour obtenir une bonne précision sur les fréquences de ces modes est le calcul *ab initio*.

Tous les calculs théoriques présentés dans cette partie ont été effectués dans le laboratoire SPMS de l'École Centrale Paris, sous la direction de Grégory Geneste.

Les calculs ont été réalisés dans le cadre de la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT) avec le programme de calculs *ab initio* SIESTA¹ (Ordejón *et al.*, 1996; Soler *et al.*,

¹ SIESTA: Spanish Initiative for Electronic Simulations with Thousands of Atoms.

2002). La DFT est une reformulation du problème de la recherche de l'état fondamental d'un gaz d'électrons plongé dans un potentiel externe (Hohenberg et Kohn, 1964), sous la forme d'un système autocohérent d'équations à une particule, appelées équations de Kohn et Sham (Kohn et Sham, 1965). Les codes DFT permettent de déterminer l'énergie et la densité électronique du gaz d'électrons dans une configuration donnée des noyaux atomiques. La connaissance de la densité électronique permet ensuite de connaître les forces subies par les noyaux et donc d'optimiser la position de ces derniers, ou encore de pratiquer de la dynamique moléculaire. En outre, la mise en œuvre de la DFT nécessite de réaliser une approximation sur une grandeur inconnue, l'énergie d'échange-corrélation. Les calculs présentés ici ont été réalisés dans le cadre de l'approximation GGA-PBE (Perdew *et al.*, 1996). Des pseudopotentiels (de type Troullier-Martins (Troullier et Martins, 1991)), opérateurs permettant de traiter uniquement les électrons de valence dans les calculs, ont également été utilisés.

Siesta décompose les fonctions d'onde de Kohn-Sham sur une base d'orbitales atomiques numériques calculées au préalable à partir de la résolution des équations de Kohn-Sham sur des atomes isolés (avec les mêmes approximations et pseudo-potentiels que ceux utilisés pour la molécule entière).

Nous avons choisi une méthode de résolution quantique (plutôt que classique) pour évaluer au mieux les interactions atomiques.

II-2. Réaction en phase gazeuse (gaz parfait)

Nous avons envisagé la transformation de N molécules de ZEN, réagissant avec N/2 molécules O₂ et donnant N molécules d'OH-ZEN. Le bilan d'énergie libre à évaluer est :

$$\Delta F_{GP}(N, V, T) = F_{GP}(N_{OH-ZEN}, V, T) - F_{GP}(N_{ZEN}, V, T) - F_{GP}(N/2 O_2, V, T) \quad (2)$$

Or $F(N/2 O_2)$ est une constante quel que soit l'enrichissement en ¹³C de la ZEN et de l'OH-ZEN. C'est pourquoi il sera inutile de l'évaluer et seule la différence entre $F(OH-ZEN)$ et $F(ZEN)$ sera pertinente¹. Il convient alors de comparer ces différences selon les enrichissements envisagés :

¹ Cette affirmation sera vérifiée dans la partie II-2.3

$$F(\text{OHZEN }^{12}\text{C}) - F(\text{ZEN }^{12}\text{C}) // F(\text{OHZEN }^{13}\text{C}) - F(\text{ZEN }^{13}\text{C}) \text{ (réaction « isodesmique¹ »)} \quad (3)$$

II-2.1. Décomposition de l'énergie libre F d'un gaz parfait

Il est souvent fait l'approximation que les degrés de liberté translationnels, rotationnels et vibrationnels sont découplés :

$$F(N, V, T) = E_0 + F_{\text{tr}}(N, V, T) + F_{\text{rot}}(N, V, T) + F_{\text{vib}}(N, V, T) \quad (4)$$

Avec :

- E_0 = énergie de la molécule dans son état fondamental (contribution électronique qui ne dépend que des liaisons créées ou rompues) ;
- $F_{\text{tr}} = -NkT(\ln(V/N) + 3/2\ln(mkT/2\pi \hbar^2) + 1)$
- $F_{\text{rot}} = -NkT \ln(\xi_{\text{rot}}^2)$
- $F_{\text{vib}} = -NkT \ln(\xi_{\text{vib}}^3)$

Et :

- N : nombre de molécules ;
- k : constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1} \text{ (J} \cdot \text{K}^{-1})$) ;
- T : la température (K) ;
- m : masse de la molécule (kg) ;
- V : volume considéré (m^3) ;
- \hbar : constante de Dirac ou constante de Planck réduite : $\hbar/2\pi = 1,054571596 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$.

$$\Delta F = \Delta E_0 + \Delta F_{\text{tr}} + \Delta F_{\text{rot}} + \Delta F_{\text{vib}} \quad (5)$$

Nous allons montrer que les trois premières contributions sont négligeables et que seule la 4^{ème} peut fournir une contribution appréciable.

¹ L'adjectif isodesmique a été créé pour désigner une réaction chimique dans laquelle le nombre et le type de liens chimiques est le même dans les réactifs et les produits. De telles réactions sont généralement hypothétiques, au sens où il n'existe pas de mécanisme envisageable qui produirait de tels réarrangements moléculaires. Le type de réaction isodesmique qui donne la plus grande précision est l'échange simple de molécules de H₂ entre les réactifs et les produits.

Warren J.H. A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations, Wavefunction Inc. (2003).

² ξ_{rot} = fonction de partition de rotation

³ ξ_{vib} = fonction de partition de vibration

- Énergie libre translationnelle

$$\Delta F_{\text{tr}} = F_{\text{tr}}(\text{N}_{\text{OH-ZEN}}) - F_{\text{tr}}(\text{N}_{\text{ZEN}}) - F_{\text{tr}}(\text{N}/2 \text{ O}_2)$$

En appliquant la formule rappelée ci-dessus, on arrive rapidement à :

$$\Delta F_{\text{tr}} = -\frac{3}{2} \text{NkT} \ln \left(1 + \frac{m_0}{m_{\text{zen}}} \right) - \frac{1}{2} F_{\text{tr}}(\text{N O}_2) \sim -\frac{3}{2} \text{NkT} \frac{m_0}{m_{\text{zen}}} - \frac{1}{2} F_{\text{tr}}(\text{N O}_2)$$

$$\text{Car } \frac{m_0}{m_{\text{zen}}} = 0,05 \ll 1$$

$$\text{Finalement, à 300 K, } |\Delta F_{\text{tr}}| \sim \frac{3}{2} \text{kT} \frac{m_0}{m_{\text{zen}}} \ll 0,025 \text{ eV/molécule.}$$

C'est pourquoi nous négligerons la contribution de ΔF_{tr} dans ΔF_{tot} .

- Énergie libre rotationnelle

$$\xi_{\text{rot}} = \frac{\sqrt{\pi}}{\sigma} \sqrt{\frac{2I_1 \text{kT}}{h^2}} \sqrt{\frac{2I_2 \text{kT}}{h^2}} \sqrt{\frac{2I_3 \text{kT}}{h^2}}, \text{ avec } I_1, I_2 \text{ et } I_3, \text{ les moments d'inertie principaux}$$

et σ le nombre de rotations qui laissent inchangée la molécule (facteur de symétrie).

$$\Delta F_{\text{rot}} = F_{\text{rot}}(\text{N}_{\text{OH-ZEN}}) - F_{\text{rot}}(\text{N}_{\text{ZEN}}) - F_{\text{rot}}(\text{N}/2 \text{ O}_2)$$

$$\text{D'où } \Delta F_{\text{rot}} = -\text{NkT} \left[\ln \left(\frac{\xi_{\text{rot}}^{\text{OHZEN}}}{\xi_{\text{rot}}^{\text{ZEN}}} \right) - \frac{1}{2} \ln \left(\xi_{\text{rot}}^{\text{O}_2} \right) \right] - \text{NkT}$$

$$\text{Or } \frac{\xi_{\text{rot}}^{\text{OHZEN}}}{\xi_{\text{rot}}^{\text{ZEN}}} = \sqrt{\frac{I_1^{\text{OHZEN}} I_2^{\text{OHZEN}} I_3^{\text{OHZEN}}}{I_1^{\text{ZEN}} I_2^{\text{ZEN}} I_3^{\text{ZEN}}}} \frac{\sigma^{\text{OHZEN}}}{\sigma^{\text{ZEN}}}$$

$$\text{Donc } \Delta F_{\text{rot}} = -\frac{1}{2} \text{NkT} \left[\ln \left(\frac{I_1^{\text{OHZEN}}}{I_1^{\text{ZEN}}} \right) + \ln \left(\frac{I_2^{\text{OHZEN}}}{I_2^{\text{ZEN}}} \right) + \ln \left(\frac{I_3^{\text{OHZEN}}}{I_3^{\text{ZEN}}} \right) \right] - \frac{1}{2} F_{\text{rot}}(\text{NO}_2)$$

$$\text{Or } \frac{I_1^{\text{OHZEN}}}{I_1^{\text{ZEN}}} \sim \frac{\sum_{i \text{ OHZEN}} m_i r_i'^2 + m_o r_o^2}{\sum_{i \text{ ZEN}} m_i r_i^2}, \text{ avec } r_i \text{ les positions des atomes (ZEN et OH-ZEN)}$$

$r_i' \sim r_i$ sauf pour le H qui est remplacé par un OH dans l'OH-ZEN.

Ceci nous permet de faire l'approximation :

$$\frac{I_1^{\text{OHZEN}}}{I_1^{\text{ZEN}}} \sim 1 + \frac{m_o}{m_{\text{zen}}}$$

Comme pour ΔF_{tr} , $\Delta F_{rot} \sim -\frac{3}{2}NkT \frac{m_o}{m_{zen}} - \frac{1}{2} F_{rot}(N O_2)$

Nous négligerons donc aussi la contribution de ΔF_{rot} dans ΔF_{tot} .

Il ne reste alors que les différences des énergies libres vibrationnelles et les différences des énergies E_0 à évaluer, dans le cas naturel et dans le cas enrichi :

$$\Delta F^{12C} = \Delta E_0^{12C} + \Delta F_{vib}^{12C} // \Delta F^{13C} = \Delta E_0^{13C} + \Delta F_{vib}^{13C}$$

Or ΔE_0^{12C} et ΔE_0^{13C} ne devraient pas être modifiées par l'enrichissement puisqu'elles ne dépendent que du nombre d'électrons périphériques (identiques dans le cas d'isotopes).

- Énergie libre vibrationnelle

L'énergie libre vibrationnelle se calcule, dans l'approximation harmonique, à partir des fréquences des modes propres de vibration qui dépendent de la masse des atomes considérés, *i.e.* faisant intervenir la masse du carbone ^{12}C et de son isotope ^{13}C .

Le calcul des modes de vibration de la ZEN et de ses métabolites hydroxylés et la comparaison entre les différences d'énergies libres des deux états (initial et final) dans le cas de composés naturels et dans le cas de composés enrichis en ^{13}C , nous fournissent ainsi une première hypothèse sur l'influence de l'enrichissement en ^{13}C sur la réactivité de la ZEN.

Pour calculer les modes de vibration, SIESTA passe par un calcul préalable de la matrice des constantes de forces, calcul effectué par le biais d'un algorithme de différences finies (les atomes sont déplacés un à un d'une petite distance $+\varepsilon$ et $-\varepsilon$ – typiquement 0,04 Bohrs - dans les trois directions, x, y et z).

Plus précisément, la matrice des constantes de forces s'écrit: $\left(\frac{\partial^2 E}{\partial u_{i\alpha} \partial u_{j\beta}} \right)_{(i,j)}$, (la dérivée étant calculée autour de la position d'équilibre stable (minimum de l'énergie potentielle)).

Avec $u_{i\alpha}$ et $u_{j\beta}$ les déplacements des atomes dans les 3 directions (i et j étant les numéros des atomes et α et β les directions x, y ou z).

La matrice dynamique $\left(\frac{1}{\sqrt{m_i m_j}} \cdot \frac{\partial^2 E}{\partial u_{i\alpha} \partial u_{j\beta}} \right)_{(i,j)}$ est déterminée à partir de cette matrice des

constantes de forces. C'est alors qu'interviennent les masses du carbone : 12 pour les

composés naturels et $12 + x\%$ ¹, x étant l'enrichissement en ^{13}C choisi. Nous avons choisi d'évaluer l'influence d'un enrichissement à 50% ($m_{\text{C}} = 12,5$) et 100% ($m_{\text{C}} = 13$). Les calculs consistent à construire à partir de la matrice des constantes de forces, la matrice dynamique, laquelle fait intervenir les masses des atomes, puis à diagonaliser cette matrice et à déterminer ses éléments propres. Les valeurs propres correspondent aux fréquences de vibration et les vecteurs propres aux vecteurs associés aux vibrations de chaque atome pour une fréquence de vibration donnée².

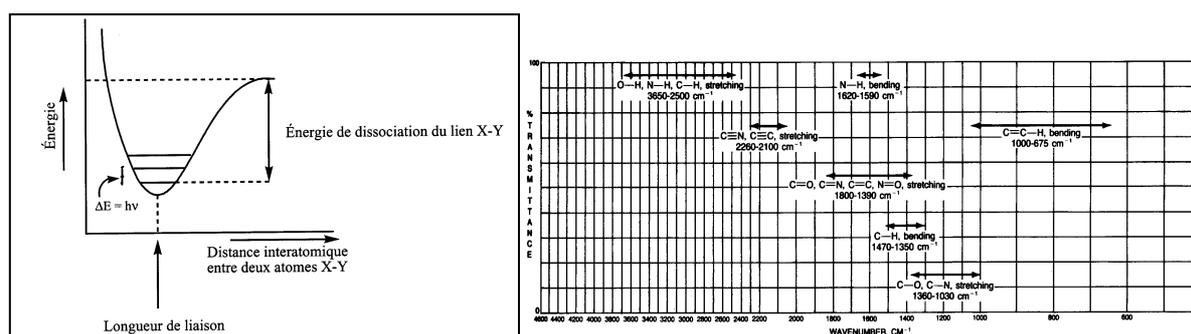


Figure IV.22 : Variation de l'énergie vibrationnelle d'une liaison chimique en fonction de la distance interatomique (gauche) ; nombres d'onde (cm^{-1}) caractéristiques de liaisons chimiques classiques (droite).

Tiré de : Seyhan Ege, dans *Organic Chemistry: Structure and Reactivity* », 4th Edition, Houghton Mifflin Company, New York, 1999.

Plus précisément, le calcul de l'énergie libre se fait à partir des fréquences des modes propres de vibration. Pour cela, rappelons que les niveaux d'énergie d'un oscillateur harmonique de pulsation propre ω sont : $(n + \frac{1}{2})\hbar\omega$ et que la fonction de partition Z d'un oscillateur harmonique est alors :

$$Z = \sum_0^{\infty} e^{-\beta(n+\frac{1}{2})h\omega} = \frac{e^{-\frac{\beta}{2}h\omega}}{1 - e^{-\beta h\omega}}, \text{ avec } \omega \text{ la pulsation de vibration de l'oscillateur.}$$

Son énergie libre est alors définie par :

$$F = -\frac{1}{\beta} \ln Z = \frac{h\omega}{2} + \frac{1}{\beta} \ln(1 - e^{-\beta h\omega})$$

En généralisant à une molécule il suffit de sommer sur tous les modes de vibration :

$$F_{\text{vib}} = \sum_i \frac{h\omega_i}{2} + kT \sum_i \ln(1 - e^{-\frac{h\omega_i}{kT}}) \quad (6)$$

¹ La masse du carbone n'est donc pas entière. Ceci n'est pas gênant : cela rend compte de l'uniformité de l'enrichissement (non local) dû à la technique d'enrichissement utilisée (C/I Effet isotopique expérimental).

²Remarque : un mode n'est pas forcément propre à une seule liaison ; il peut être délocalisé.

$$\text{Avec } \beta = \frac{1}{kT}$$

Nous avons appliqué cette dernière formule pour calculer les énergies libres de la ZEN et de l'OH-ZEN, naturels ou enrichis.

II-2.2. Optimisation géométrique de la ZEN et de l'OH-ZEN

Afin de calculer les modes de vibration de la ZEN et de ses métabolites (seule grandeur faisant intervenir la masse), il convient de déterminer préalablement la géométrie la plus stable énergétiquement. C'est pourquoi nous avons commencé par une optimisation de la structure en utilisant le code SIESTA.

La géométrie a été optimisée pour la ZEN à partir des coordonnées expérimentales cristallographiques déterminées par R-X et tirées de l'article de Panneerselvam (Panneerselvam *et al.*, 1996).

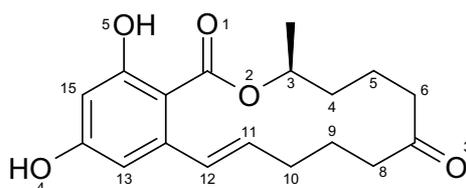


Figure IV.23 : Molécule de zéaralénone (ZEN).

Partant de ces coordonnées nous avons déterminé la géométrie optimale en minimisant l'énergie. La supercellule utilisée pour l'optimisation est un cube de 30 angströms de côté dans laquelle une molécule de ZEN a été positionnée à l'origine. La géométrie de la ZEN est ensuite optimisée par l'algorithme de gradient conjugué de SIESTA jusqu'à ce que les composantes de toutes les forces soient inférieures à 0,01 eV/Å. Ceci assure une précision sur l'énergie largement inférieure à 0,01 eV et une précision inférieure à 0,01 Å sur les distances interatomiques.

Nous partons de la géométrie initiale pour déterminer celles de deux diastéréoisomères des métabolites OH-ZEN, en rajoutant le groupe OH sur le carbone 8 (isomère R pour OH-ZEN 1 et isomère S pour OH-ZEN 2).

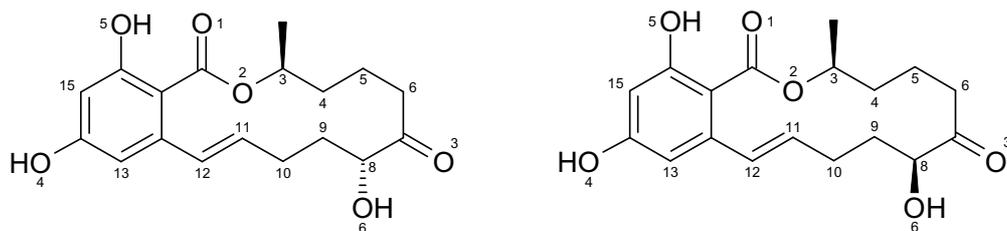


Figure IV.24 : OH-ZEN (gauche : 1 ; droite : 2).

Nous avons choisi de placer le groupement OH sur ce carbone 8 parce qu'une récente publication confirme l'existence de plusieurs formes hydroxylées de la ZEN avec les groupements OH sur la boucle aliphatique de la ZEN (Pfeiffer *et al.*, 2007). De plus, nos travaux de spectrométrie de masse menés en parallèle indiquent que le groupe OH du métabolite OH-ZEN majoritairement formé dans les incubations avec des microsomes de rats traités au phénobarbital, serait sur le carbone vicinal du groupement carbonyle de la ZEN (C₈ de notre numérotation). C'est donc cette structure que nous retenons en considérant la forme S et la forme R du carbone porteurs du groupe OH.

Les calculs d'optimisation de géométrie par minimisation de l'énergie nous donnent les deux géométries suivantes :

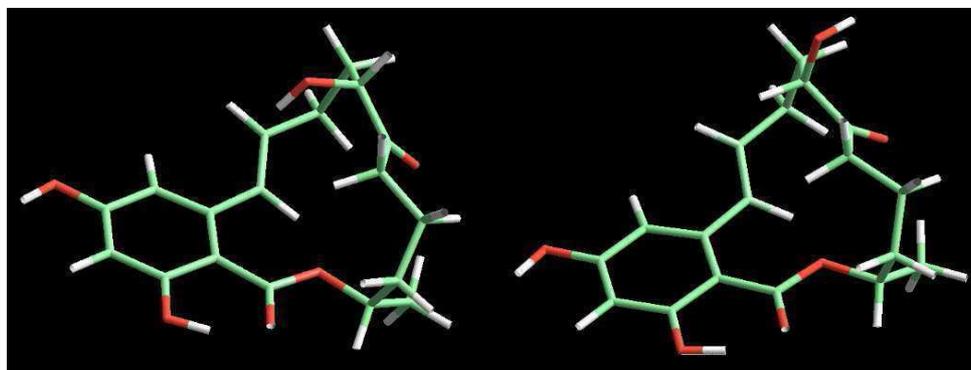


Figure IV.25 : Géométries optimisées de l'OH-ZEN 1 (gauche) et de l'OH-ZEN 2 (droite), dans le vide dans une boîte de 12 Å de côté en partant des coordonnées cristallographiques expérimentales de la ZEN et en rajoutant le groupement OH sur le carbone 8.

Vert : C ; rouge : O ; blanc : H.

Tableau IV.5 : Distance interatomiques expérimentales (exp) et calculées (GGA) de la ZEN et de l'OH-ZEN1. Ces valeurs sont données en Å.

Distances	ZEN (exp)	ZEN (GGA)	OH-ZEN 1 ¹ (GGA)
C ₁ -O ₁	1,229	1,253	1,252
C ₁ -O ₂	1,319	1,350	1,349
C ₃ -C ₂	1,467	1,523	1,523
C ₃ -O ₂	1,490	1,465	1,467
C ₃ -C ₄	1,536	1,536	1,536
C ₄ -C ₅	1,525	1,539	1,539
C ₅ -C ₆	1,513	1,542	1,541
C ₆ -C ₇	1,467	1,528	1,526
C ₇ -O ₃	1,222	1,226	1,226
C ₇ -C ₈	1,494	1,524	1,541
C ₈ -C ₉	1,521	1,534	1,540
C ₉ -C ₁₀	1,537	1,549	1,547
C ₁₀ -C ₁₁	1,473	1,505	1,507
C ₁₁ -C ₁₂	1,330	1,360	1,364
C ₁₂ -C ₁₈	1,458	1,479	1,479
C ₁₈ -C ₁₃	1,412	1,405	1,406
C ₁₃ -C ₁₄	1,354	1,416	1,416
C ₁₄ -O ₄	1,379	1,357	1,357
C ₁₄ -C ₁₅	1,377	1,402	1,401
C ₁₅ -C ₁₆	1,374	1,414	1,414
C ₁₆ -O ₅	1,354	1,327	1,326
C ₁₆ -C ₁₇	1,416	1,446	1,447
C ₁₇ -C ₁₈	1,415	1,440	1,447
C ₈ -O ₆	-	-	1,416

Pour la ZEN, $\sqrt{\sum |d_{\text{exp}} - d_{\text{GGA}}|^2} = 0,217$

La différence d'énergie entre les deux structures précédentes est négligeable : $|\Delta E_{\text{OH-ZEN1-OH-ZEN2}}| = 0,1 \text{ eV}$.



Figure IV.26 : géométrie optimisée de la ZEN dans le vide une boîte de 12 Å de côté en partant des coordonnées cristallographiques expérimentales de la ZEN.

Vert : C ; rouge : O ; blanc : H.

¹ Les distances interatomiques expérimentales de l'OH-ZEN n'ont pas été déterminées.

De plus, nous pouvons calculer les valeurs des ΔE_0 relatifs aux deux OH-ZEN :

$$\Delta E_0 = \Delta E_{\text{OH-ZEN}} - \Delta E_{\text{ZEN}} - \frac{1}{2} \Delta E_{\text{O}_2}$$

ΔE_0 (1) = - 1,9 eV pour l'OH-ZEN 1 et ΔE_0 (2) = - 1,8 eV pour l'OH-ZEN 2.

Ces valeurs interviendront dans le bilan énergétique final de la réaction d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN, en plus de l'énergie vibrationnelle.

Enfin, afin de vérifier que nous ne nous plaçons pas à un minimum local « instable » d'énergie, nous avons effectué sur ces différentes configurations de ZEN et OH-ZEN des simulations de dynamique moléculaire à différentes températures (1000 et 2000 K sur 5000 pas de calculs). Ces températures ont volontairement été choisies importantes afin de donner au système suffisamment d'énergie pour franchir une barrière énergétique si l'OH-ZEN se trouvait à un minimum local. Néanmoins, même avec cette précaution, nous ne sommes pas assurés d'avoir localisé le minimum absolu.

L'examen de l'évolution des positions des atomes de la molécule au cours de la dynamique ne montre pas de modification majeure de la géométrie : seuls des phénomènes de vibration sont visibles.

II-2.3. Modes de vibration

Comme annoncé au paragraphe II-1, nous nous sommes intéressés à la comparaison entre les différences d'énergies vibrationnelles des deux états (initial et final) dans le cas des composés naturels et dans le cas de composés enrichis en ^{13}C . Les énergies vibrationnelles des composés ont alors été calculées à partir des fréquences de vibration d'après la formule (6) rappelée au paragraphe II-2.1.

Nous avons choisi de limiter nos calculs à l'OH-ZEN1 qui a l'énergie ΔE_0 la plus basse.

Tableau IV.6 : Énergies vibrationnelles (eV) associées à la ZEN et à l'OH-ZEN dans le vide à 20°C avec 0, 50 et 100% de ^{13}C .

enrichissement ^{13}C (%)	0	50	100
$F_{\text{vib}}^{\text{ZEN}}$ (eV)	-0,9867	-1,0140	-1,0401
$F_{\text{vib}}^{\text{OH-ZEN1}}$ (eV)	-1,0427	-1,0701	-1,0964
$F_{\text{vib}}^{\text{O}_2}$ (eV)	0,0066	0,0066	0,0066
ΔF_{vib} (eV)	-0,0593	-0,0595	-0,0597
$\Delta E_0 = \Delta E_{\text{OH-ZEN1}} - \Delta E_{\text{ZEN}} - \frac{1}{2} \Delta E_{\text{O}_2}$	- 1,9	- 1,9	-1,9
$\Delta F = \Delta F_{\text{vib}} + \Delta E_0$ (eV)	- 1,9593	- 1,9595	-1,9597

D'un point de vue thermodynamique, l'enrichissement ^{13}C n'a donc pas d'effet sur la réaction d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN1 en phase gazeuse : un enrichissement de 50% ou 100% de ^{13}C n'introduit qu'une variation d'énergie libre de l'ordre du dix millième d'eV par rapport à l'énergie libre de la réaction d'oxydation en considérant une teneur de 0% de ^{13}C de la ZEN et donc de l'OH-ZEN1 formé.

L'enrichissement en ^{13}C n'a pas d'effet sur le bilan thermodynamique ΔF de la réaction d'oxydation.

En effet, comme le montre la répartition des fréquences¹ de la ZEN et de l'OH-ZEN en fonction des taux de ^{13}C (Figure IV.27), l'enrichissement modifie certaines fréquences (entre 800 et 1000 cm^{-1} et entre 1600 et 1800 cm^{-1} , par exemple) mais globalement ces petits changements de fréquences se retrouvent de la même façon dans les deux composés ZEN et OH-ZEN.

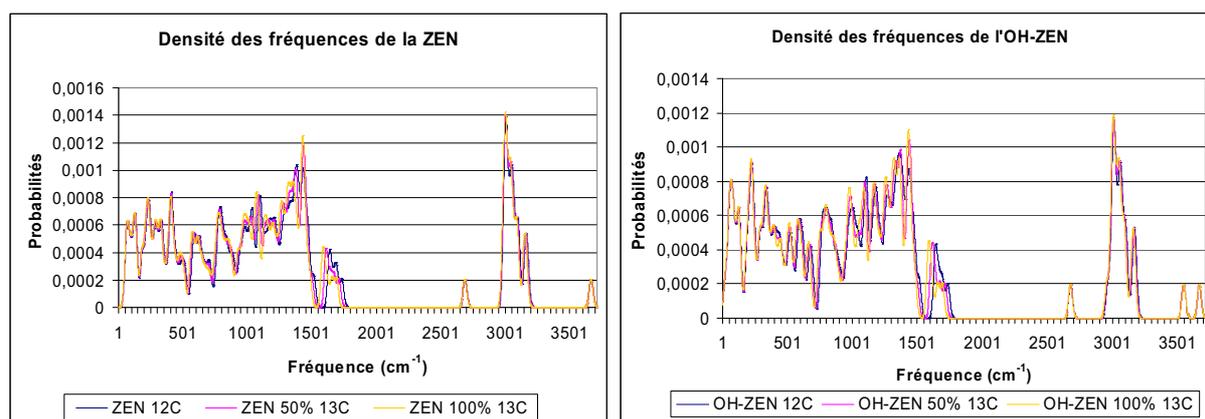


Figure IV.27 : Répartition des fréquences¹ de vibration de la ZEN et de l'OH-ZEN dans le vide selon les enrichissements en ^{13}C .

Par la suite et pour les études de l'effet isotopique dans un solvant, nous ne considérerons que le bilan de l'énergie vibrationnelle, sans tenir compte du bilan ΔE_0 puisque l'enrichissement ne modifie pas son calcul.

II-2.4. Conclusions

Il convient de noter que les résultats précédents ne renseignent que sur l'aspect thermodynamique de la réaction d'oxydation. En effet, nous ne tenons ici compte que de l'état

¹ La répartition des fréquences ν de la ZEN (resp. de l'OH-ZEN) a été obtenue en sommant des gaussiennes ayant pour moyenne les fréquences ν de la ZEN (resp. de l'OH-ZEN) et pour écart type 15 cm^{-1} . Ces gaussiennes ont été obtenues en convoluant une gaussienne centrée et d'écart type 15 cm^{-1} avec un dirac δ_ν .

final et de l'état initial de notre système, sans tenir compte du chemin réactionnel suivi. Il est probable que d'un point de vue cinétique, l'enrichissement joue un rôle et modifie le chemin réactionnel et/ou la vitesse de réaction (l'enrichissement modifiera à la fois les fréquences d'attaque et les barrières d'énergie). Ceci est d'autant plus probable que cette réaction d'oxydation fait intervenir un catalyseur protéique (cytochrome P450) qui pourrait réagir différemment avec une molécule de ZEN enrichie et avec une molécule de ZEN naturelle. Cet aspect ne sera pas étudié ici par souci de simplification : en effet l'introduction d'un 3^{ème} partenaire, qui plus est de structure complexe (protéine), nécessiterait la prise en compte d'un état de transition (ou plusieurs), jusque là inconnu(s) pour la formation de l'OH-ZEN.

Enfin, ces résultats ont été obtenus dans le vide et en phase gazeuse, c'est-à-dire dans des conditions non réalistes. En effet le contexte de notre réaction est un contexte biologique, *i.e.* le milieu réactionnel est un fluide biologique, proche d'un milieu aqueux. C'est pourquoi, dans un premier temps, afin de tenir compte de l'effet solvant, nous allons nous placer dans une boîte d'eau afin de se rapprocher au plus près des conditions expérimentales.

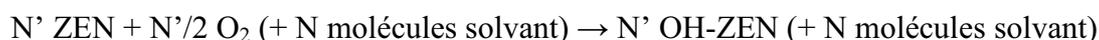
II-3. Résultats dans l'eau

II-3.1. Les solutions diluées

Nous abordons ici de façon très schématique le problème de l'enrichissement lorsque la réaction se déroule dans un solvant. Nous utilisons le formalisme général des solutions diluées pour lesquelles l'énergie libre peut s'écrire :

$$F = F_{\text{solvant}} + F_{\text{int}} + F_{\text{GP}}$$

La transformation envisagée est la suivante :



La variation d'énergie libre associée à cette transformation est donc :

$$\Delta F(N, N', V, T) = \Delta F_{\text{solvant}} + \Delta F_{\text{int}} + \Delta F_{\text{GP}} = \Delta F_{\text{int}} + \Delta F_{\text{GP}}$$

Le terme ΔF_{GP} a été évalué au paragraphe précédent et nous avons pu montrer que l'enrichissement était sans influence sur lui. Le terme $\Delta F_{\text{solvant}}$, variation d'énergie libre du solvant en l'absence du soluté est nul. La différence tient donc au terme ΔF_{int} , que l'on peut décomposer en un terme purement électronique (énergie d'interaction solvant-soluté) et un

terme vibrationnel. Le premier reste bien sûr inchangé sous l'effet de l'enrichissement. Le second peut en revanche être modifié.

Pour évaluer la variation d'énergie libre vibrationnelle d'interaction solvant-soluté et connaître l'influence sur ce terme de l'enrichissement en ^{13}C , il nous faut construire tout autour de la ZEN (resp. OH-ZEN) un environnement qui soit représentatif du solvant (Ikryannikova et al., 2004).

Pour « fabriquer » un tel échantillon, nous nous inspirons des techniques employées pour la simulation des matériaux amorphes : nous plaçons dans une boîte de simulation¹ (côté 12 Å) une molécule de ZEN (resp. OH-ZEN) et un nombre de molécules de solvant reproduisant la densité du solvant (64 dans le cas de l'eau). Puis nous effectuons sur ce système une simulation de dynamique moléculaire en deux étapes : recuit pour imposer la température, puis évolution dans l'ensemble microcanonique (volume constant) sur 2 picosecondes.

De façon générale, les dynamiques moléculaires que nous avons faites n'ont jamais eu pour but de simuler une évolution réelle du système mais simplement de fournir un échantillonnage (imparfait, certes) de l'espace des configurations afin de déterminer une ou plusieurs configurations solvatées pertinentes.

Nous récupérons de cette dernière phase un certain nombre de configurations ayant des énergies potentielles basses et nous les optimisons. Les configurations optimisées nous servent ensuite à évaluer la variation, sous l'effet de l'enrichissement, de l'énergie libre d'interaction solvant-soluté. Il convient de noter ici que nous ne simulons pas un liquide car les configurations finales utilisées sont optimisées.

La géométrie des configurations correspondant aux minima d'énergie obtenus est alors optimisée puis les fréquences de vibration sont calculées pour chaque géométrie minimisée à un enrichissement donné. La même démarche est alors renouvelée pour différents taux d'enrichissement en ^{13}C pour la ZEN et pour l'OH-ZEN. Les différences d'énergies libres pour un enrichissement donné sont alors caractéristiques de la réaction d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN. Une comparaison de ces différences selon l'enrichissement permet là encore d'évaluer l'influence de l'enrichissement en ^{13}C sur cette oxydation.

II-3.2. Optimisation géométrique

➤ ZEN

¹ Nous choisissons des conditions aux limites périodiques afin de minimiser les effets de bord.

Nous avons placé uniformément 64 molécules d'eau (4^3) dans un cube de 12 Å puis procédé à une dynamique moléculaire à 300 K en 2 temps :

- phase 1 de 400 fs (phase d'équilibration);
- phase 2 de 2 ps (phase de dynamique).

Nous avons récupéré 9 configurations dont nous avons optimisé la géométrie par la suite.

Remarques : on constate, comme dans les précédentes dynamiques, que la pression est négative. Cela signifie que la solution artificiellement recréée dans la boîte d'eau n'est pas assez dense, *i.e.*, quelques molécules d'eau supplémentaires auraient pu être rajoutées.

Néanmoins, nous pouvons vérifier que la pression moyenne est la même (ou proche) dans le cas de la ZEN et dans le cas de l'OH-ZEN. : -14,25 kBar pour la ZEN et - 14,75 kBar pour l'OH-ZEN.

Les énergies finales des configurations optimisées sont très proches (Tableau IV.7). Ces différences sont significatives dans la mesure où l'optimisation à 0,04 eV/Å assure une précision numérique inférieure à 0,01 eV.

Tableau IV.7 : Différences des énergies potentielles (eV) minimales sélectionnées à partir de la dynamique moléculaire de la ZEN à 300 K.

n° configuration	Δ Énergie (eV)
1	0
2	0,12
3	0,33
4	0,36
5	0,38
6	0,41
7	0,43
8	0,49
9	0,5

Par ailleurs, en regardant de plus près les géométries, on constate que seul l'agencement des molécules d'eau diffère d'une configuration à l'autre. Elles sont donc très proches géométriquement. Les calculs des modes de vibration étant très longs, nous ne considérerons

que la 1^e configuration du Tableau IV.7, d'énergie minimale après optimisation géométrique, pour la détermination de ses fréquences de vibration.

D'autre part, de façon qualitative, nous constatons que les molécules d'eau restent assez éloignées de la ZEN, sauf autour des groupements hydrophiles qui forment des liaisons hydrogène (3 en tout sur la molécule : les deux OH aromatiques et le groupement carbonyle de la fonction ester). Ceci est en accord avec les caractéristiques physico-chimiques de la ZEN qui est très peu soluble dans l'eau mais l'est bien plus dans des solvants organiques tels que l'acétonitrile, le méthanol ou le DMSO. Cependant, pour des raisons de facilité et de simplification de calculs, nous avons choisi de nous placer dans une boîte d'eau pour commencer. Un deuxième solvant sera l'objet du paragraphe suivant.

➤ OH-ZEN

Après avoir optimisé la ZEN dans l'eau nous appliquons le même raisonnement à l'OH-ZEN1 afin d'obtenir une ou plusieurs configurations de basse énergie à partir desquelles nous calculerons les fréquences de vibrations de la molécule naturelle et de la molécule enrichie en ¹³C.

Partant des coordonnées de la ZEN dans l'eau, nous rajoutons le groupement OH de manière à former OH-ZEN1 dans une boîte d'eau de 12 Å. Nous appliquons la même procédure pour la dynamique moléculaire. Plusieurs configurations correspondant à des minima locaux de l'énergie potentielle, sont sélectionnées au cours du calcul de la dynamique moléculaire et sont optimisées pour ensuite calculer les modes de vibration.

Tableau IV.8 : Différences d'énergies potentielles minimales (eV) des configurations sélectionnées à partir de la dynamique moléculaire de l'OH-ZEN à 300 K et optimisées.

n° configuration	ΔÉnergie (eV)
1	0
2	0,08
3	0,11

Par la suite, nous nous limiterons à deux configurations (n°1 et 2).

II-3.3. Modes de vibration

Après avoir optimisé la ZEN et l'OH-ZEN1 nous pouvons calculer les fréquences de vibration des molécules naturelles et des molécules enrichies en ^{13}C pour calculer la différence et la comparer à celles calculées précédemment dans le vide.

➤ Comparaison ZEN/OH-ZEN

Comme dans le vide, la comparaison entre les différences d'énergies libres entre l'état initial (ZEN) et l'état final (OH-ZEN) sans tenir compte de l'oxydant (O_2) nous permet d'évaluer l'influence éventuelle de l'enrichissement en ^{13}C , même si ces différences d'énergies ne correspondent à aucune grandeur réelle :

$$F(\text{OH-ZEN } ^{12}\text{C}) - F(\text{ZEN } ^{12}\text{C}) // F(\text{OH-ZEN } ^{13}\text{C}) - F(\text{ZEN } ^{13}\text{C})$$

Ici encore la répartition des fréquences de la ZEN et de l'OH-ZEN (Figure IV.28) nous montre que si l'enrichissement en ^{13}C modifie légèrement quelques fréquences vibrationnelles de la ZEN et de l'OH-ZEN, ces modifications affectent les mêmes gammes de fréquences pour la ZEN et pour l'OH-ZEN.

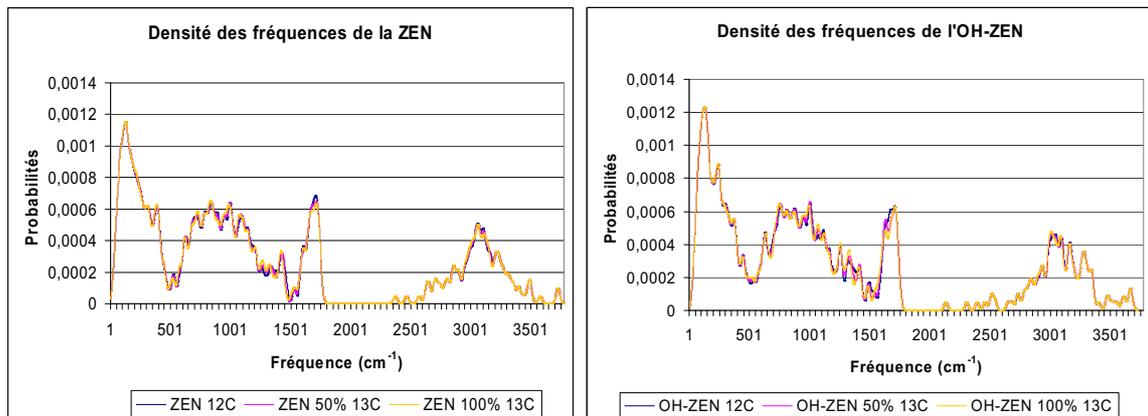


Figure IV.28 : Répartition des fréquences de la ZEN et de l'OH-ZEN (1) dans l'eau suivant les enrichissements en ^{13}C (Cf. note de bas de page 1 p 184).

Tableau IV.9 : Énergies vibrationnelles (eV) associées à la ZEN et à l'OHZEN (configurations n°1 et 2) dans l'eau à 20°C avec 0, 50 et 100% de ^{13}C .

Enrichissement ^{13}C (%)	0	50	100
F_{ZEN} (eV)	-5,9777	-6,0061	-6,0333
$F_{\text{OH-ZEN1}}^{(1)}$ (eV)	-5,9960	-6,0246	-6,0521
$F_{\text{OH-ZEN1}}^{(2)}$ (eV)	-6,3134	-6,3344	-6,3584
Différence 1 (eV)	-0,0182	-0,0185	-0,0188
Différence 2 (eV)	-0,3356	-0,3283	-0,3251

Nous n'avons plus tenu compte ici de F_{O_2} ni de ΔE_0 puisqu'ils ne dépendent pas des enrichissements. On constate une différence de bilan énergétique entre les deux configurations (1) et (2) : de l'ordre de -0,3 eV. Même si les bilans ne sont pas les mêmes pour les deux configurations, n'oublions pas que nous cherchons ici à mesurer l'effet de l'enrichissement en ^{13}C sur le métabolisme de la ZEN en OH-ZEN (dans l'eau). Pour cela il suffit de comparer les différences d'énergies entre le réactif (la ZEN) et son métabolite formé (OH-ZEN) suivant les différentes teneurs en ^{13}C . Il apparaît alors que les bilans énergétiques restent constants avec l'enrichissement et ne diffèrent que d'un centième d'eV pour la configuration (2) et d'un dix millième d'eV pour la configuration (1). Ces deux valeurs étant extrêmement faibles devant la valeur des bilans énergétiques dans les deux cas, nous pouvons penser que l'enrichissement isotopique au ^{13}C n'influence pas notablement le bilan énergétique de la réaction de formation de l'OH-ZEN à partir de la ZEN.

II-3.4. Conclusions

Ce deuxième résultat sur la faible importance d'effet isotopique sur la réactivité de la ZEN reste à confirmer dans un autre solvant. En effet, pour commencer, nous avons choisi de nous placer dans l'eau pour plusieurs raisons :

- Par souci de simplicité : une boîte d'eau est facile à construire ;
- Par souci de réalité biologique : les fluides biologiques sont majoritairement aqueux.

Néanmoins, après ces considérations, nous ne pouvons que modérer la pertinence de notre choix dans la mesure où la ZEN n'est que très peu soluble dans l'eau expérimentalement. C'est pourquoi, nous avons poursuivi notre étude par des calculs dans une boîte d'acétonitrile CH_3CN .

II-4. Résultats dans l'acétonitrile

A la suite à l'étude de la ZEN et de l'OH-ZEN dans l'eau, nous avons pu constater que peu d'interactions de type liaisons hydrogène se formaient entre ces derniers et l'eau. De plus, d'après les configurations optimisées, les molécules d'eau restent éloignées de la ZEN ou de l'OH-ZEN. En effet, nous confirmons expérimentalement que la ZEN n'est pas soluble dans l'eau. Pour plus de cohérence, nous choisissons d'étudier l'influence de l'enrichissement dans un solvant dans lequel la ZEN et l'OH-ZEN sont solubles et que nous utilisons quotidiennement au laboratoire : l'acétonitrile.

II-4.1. Optimisation géométrique

Le protocole d'étude est en tout point semblable à celui que nous avons suivi pour l'étude dans l'eau. La ZEN (resp. OH-ZEN) est positionnée dans une boîte cubique de 12 Å de côté, dans laquelle 18 molécules d'ACN sont également placées. Dans la configuration initiale, les 18 molécules sont toutes alignées. Afin de déterminer une ou plusieurs configurations solvatées pertinentes, nous choisissons d'explorer l'espace des configurations par dynamique moléculaire. La procédure utilisée pour la ZEN (resp. OH-ZEN) est la suivante :

- Le système est équilibré sur 1 picoseconde à la température de 300 K (recuit).
- La dynamique est poursuivie ensuite sur 2 picosecondes en démarrant de la configuration (positions et vitesses) obtenue à la fin du recuit.

Les deux configurations de plus basse énergie potentielle sont isolées de la 2^{ème} phase et leur énergie minimisée (notées configuration (1) et (2)). Puis les modes de vibration sont calculés sur ces deux configurations optimisées. La même procédure est répétée ensuite à une température de 900 K afin de vérifier si le système explore des configurations de plus basse énergie.

II-4.2. Résultats

Comme dans les précédents milieux, la répartition des fréquences de la ZEN et de l'OH-ZEN (Figure IV.29) est très peu altérée par l'enrichissement en ¹³C. Seulement quelques fréquences vibrationnelles de la ZEN et de l'OH-ZEN diffèrent d'un enrichissement à l'autre affectant les mêmes gammes de fréquences pour la ZEN et pour l'OH-ZEN (1000-1400 cm⁻¹ et 1600-2000 cm⁻¹).

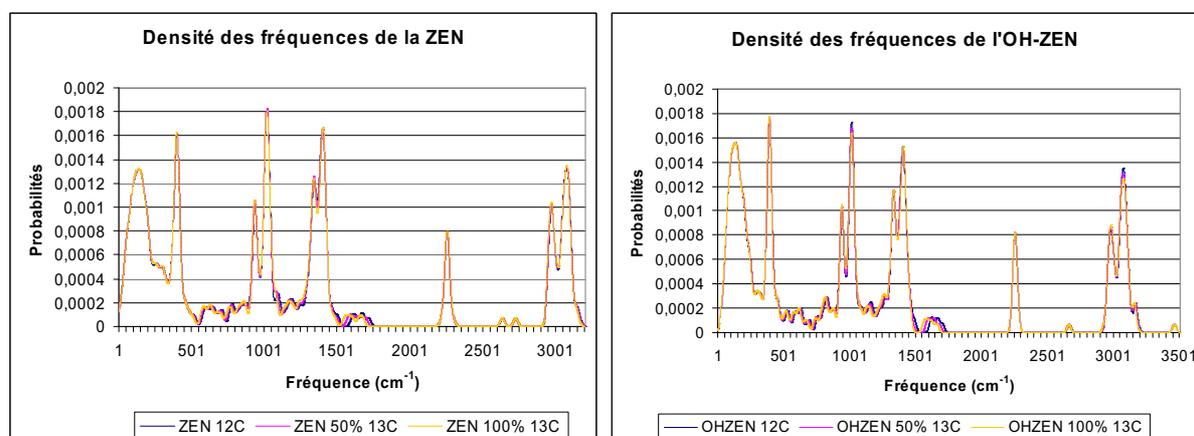


Figure IV.29 : Répartition des fréquences de la ZEN et de l'OH-ZEN (1) dans l'ACN avec différents enrichissements en ¹³C (0, 50 et 100%) (Cf. note de bas de page 1 p 184).

Plus précisément, les bilans énergétiques de la réaction isodesmique d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN dans l'ACN ne sont pas non plus modifiés par l'enrichissement ^{13}C (Tableau IV.10).

Tableau IV.10 : Énergies vibrationnelles (eV) associées à la ZEN et à l'OHZEN (configurations n°1 et 2) dans l'eau à 20°C avec 0, 50 et 100% de ^{13}C .

Enrichissement ^{13}C (%)	0	50	100
F_{ZEN} (eV)	-5,6454	-5,6868	-5,6948
$F_{\text{OH-ZEN}}^{(1)}$ (eV)	-5,5490	-5,5934	-5,6014
$F_{\text{OH-ZEN}}^{(2)}$ (eV)	-6,1497	-6,1721	-6,2190
Différence 1 (eV)	0,0963	0,0933	0,0933
Différence 2 (eV)	-0,5043	-0,4853	-0,5242

Là non plus nous n'avons pas tenu compte de F_{O_2} ni de ΔE_0 qui ne dépendent pas des enrichissements et nous avons considéré la réaction isodesmique d'oxydation. Les différences d'énergies entre le réactif (la ZEN) et son métabolite formé (OH-ZEN) suivant les différents teneurs en ^{13}C , montrent que les bilans énergétiques restent constants avec l'enrichissement et ne diffèrent que d'un millième d'eV pour la configuration (1) et d'un dixième d'eV pour la configuration (2). Ces deux valeurs étant négligeables, nous pouvons penser que l'enrichissement isotopique au ^{13}C n'influence pas le bilan énergétique de la réaction de formation de l'OH-ZEN à partir de la ZEN.

II-5. Discussion et conclusions

L'étude que nous avons menée et qui a été orientée au fur et à mesure des résultats obtenus nous a permis de considérer successivement la réactivité de la ZEN dans le vide, puis dans différents solvants. Si l'eau a été considérée dans un premier temps, nous avons rapidement pu constater au travers des dynamiques moléculaires de la ZEN et de l'OH-ZEN que ce milieu n'était pas adapté puisque très peu d'interactions apparaissaient entre les molécules d'eau et les deux composés. Nous avons montré que les différences d'énergie libre ne variaient pas davantage dans l'eau ni dans le vide. Ceci nous a confortés dans l'idée que l'influence de l'enrichissement ^{13}C reste limitée dans la réaction de formation de l'OH-ZEN. Afin de valider ce résultat théorique, nous nous sommes placés dans un deuxième temps dans l'acétonitrile, solvant dans lequel la ZEN et ses métabolites sont parfaitement solubles. De plus, l'acétonitrile peut être considéré comme un modèle mimant la phase lipidique et les membranes cellulaires présentes *in vivo* et *in vitro*. Cette dernière étape a montré que

l'enrichissement isotopique au ^{13}C n'affectait pas les bilans énergétiques de la réaction de formation d'OH-ZEN. Aucun effet isotopique n'a pu être mis en évidence ici.

Néanmoins, cette étude reste très théorique et il convient de rappeler que nous avons beaucoup simplifié le problème initial en ramenant la réaction de formation de l'OH-ZEN à une simple réaction d'oxydo-réduction, laissant de côté l'action du catalyseur (une enzyme de la famille des P450s) et sans qui la réaction ne pourrait avoir lieu. En particulier nous ne nous sommes pas intéressés à l'interaction et au transfert d'électrons qui peut avoir lieu entre l'hème du P450, la ZEN et l'OH-ZEN. Une approche cinétique pourrait être adaptée pour étudier les barrières énergétiques de la réaction entre une molécule de ZEN naturelle et les cytochromes 2C8 et 3A4 et comparer ces interactions avec différents taux d'enrichissement en ^{13}C de la ZEN.

CHAPITRE V

EXEMPLES D'UTILISATION DE STANDARDS

INTERNES ¹³C

I. Dosages de zéaralénone dans différentes matrices

L'objectif principal de cette étude portait sur l'utilisation d'un standard interne de ZEN, enrichi en ^{13}C afin de doser la ZEN naturelle contenue dans différents types d'échantillons biologiques, allant d'extraits de cultures de champignons sur des céréales enrichies au ^{13}C , à du plasma ou des urines de rats traités à la ZEN. Si initialement nous disposions au laboratoire de ZEN 10%- ^{13}C , nous avons pu utiliser de la ZEN 39%- et 81%- ^{13}C par la suite.

I-1. Dosage de la ZEN dans des extraits de céréales

L'objectif secondaire ici était de déterminer la concentration de ZEN ^{13}C dans des extraits bruts de cultures de *Fusarium culmorum* cultivées sur des grains de blé enrichis à 10% de ^{13}C (souche G₅G₇). De tels extraits seront appelés par la suite « extraits bruts » car ils contiennent, outre de la ZEN, un mélange d'autres composés non identifiés parmi lesquels certains pourraient être des mycotoxines.

La détermination de ces concentrations nous permettra par la suite d'utiliser ces solutions enrichies comme standards internes pour le dosage d'échantillons biologiques contenant de la ZEN naturelle (Figure V.1).

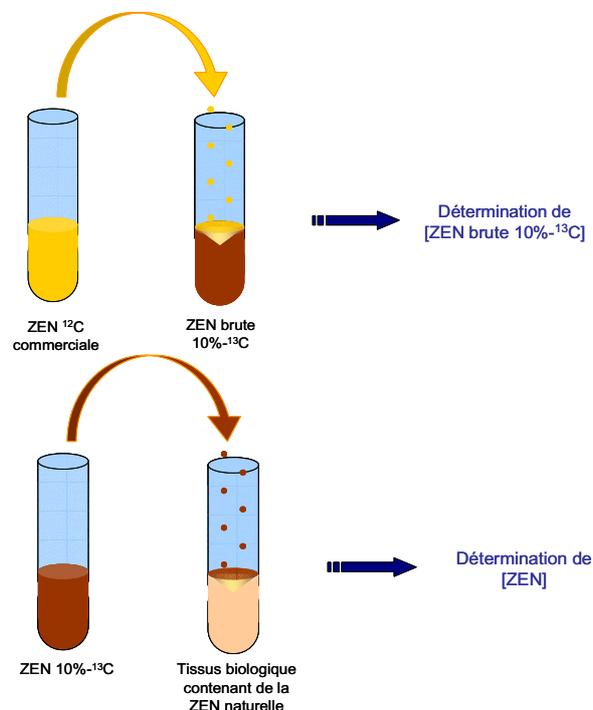


Figure V.1 : Méthodologie suivie pour les dosages de ZEN. Dans un premier temps les solutions de ZEN ^{13}C sont dosées à partir de ZEN commerciale ^{12}C utilisée comme standard interne. Dans un second temps, les solutions de ZEN ^{13}C sont utilisées comme standards internes pour doser des échantillons biologiques contenant de la ZEN naturelle.

I-1.1. Méthodologie

Pour commencer, nous avons utilisé une solution de ZEN ^{12}C commerciale (dite ZEN ^{12}C par la suite) comme standard interne pour le calcul de la concentration inconnue d'une solution brute de ZEN ^{13}C (de concentration c). Pour cela, nous avons enregistré les spectres de la solution inconnue de concentration c et celui d'un mélange de standard interne (10^{-4} M) et de solution enrichie (c).

La méthode de quantification dite des ajouts dosés a permis d'accéder à la concentration de ZEN dans les extraits. Une quantité « a » (0,02 nmoles) et « $5a$ » (0,1 nmoles) de ZEN ^{12}C ont été rajoutées dans chaque extrait brut contenant la ZEN ^{13}C . Les analyses ont été faites par spectrométrie de masse afin de pouvoir exploiter les massifs isotopiques (Figure V.2).

La solution brute de ZEN étant enrichie à 10% ^{13}C , les spectres de masse du standard interne (SI) ^{12}C et de la ZEN ^{13}C (analyte ici) se superposent (Figure V.3, droite). Afin de déterminer quelle est la part due au standard et celle due à l'analyte, nous avons utilisé l'intensité du pic à m/z 320 qui est nulle pour le SI et non nulle pour l'analyte. Cette intensité est la même dans le spectre du mélange et dans celui de la ZEN ^{13}C seule. Ainsi le rapport des intensités $I_{317(13\text{C})}$ et $I_{320(13\text{C})}$ doit être le même dans les deux spectres.

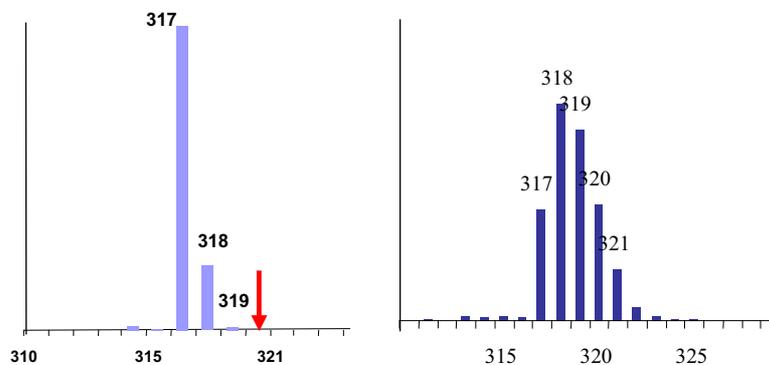


Figure V.2 : Spectre de masse expérimentaux de la ZEN ^{12}C (gauche) et de la ZEN 10% ^{13}C (droite).

Dans le spectre du mélange ^{12}C et ^{13}C , la part du pic à m/z 317 due à la ZEN enrichie au ^{13}C est déterminée grâce au pic à m/z 320 (uniquement dû au ^{13}C) et au rapport des intensités I_{317}/I_{320} du spectre de la ZEN enrichie au ^{13}C . En effet ce rapport est constant pour une même concentration de ^{13}C . Ainsi la part due à la ZEN ^{12}C est déduite par soustraction (en bleu sur la Figure V.3).

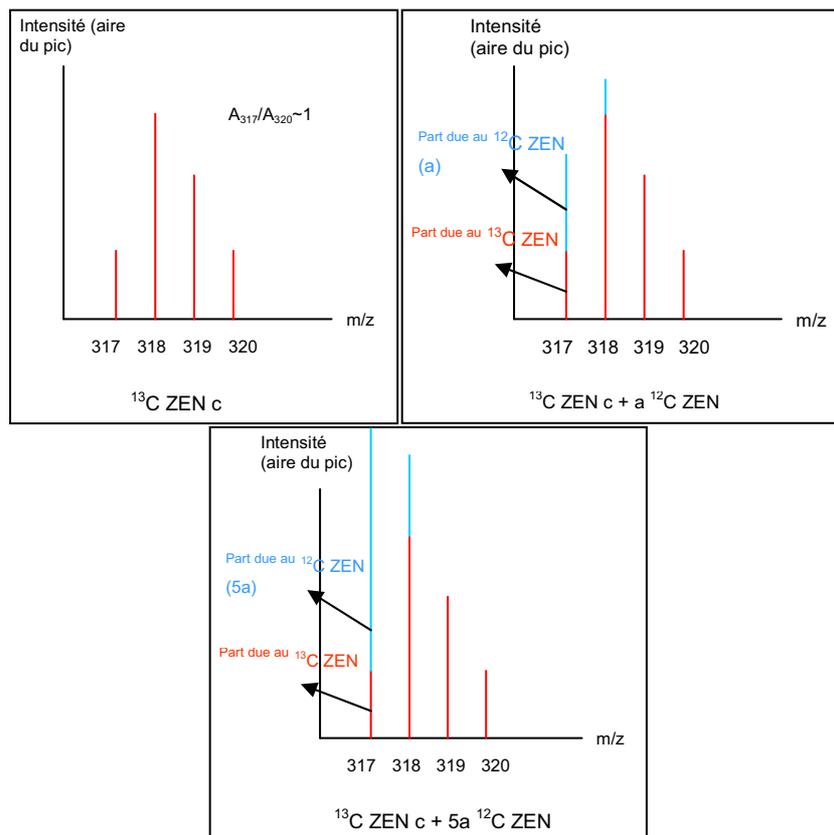


Figure V.3 : Simulations du spectre de masse de la ZEN 10%- ^{13}C (gauche), d'un mélange de ZEN 10%- ^{13}C + a ZEN ^{12}C (milieu) et d'un mélange de ZEN 10%- ^{13}C + 5a ZEN ^{12}C (droite).

Les spectres rouges correspondent à la partie des spectres relative à la ZEN 10%- ^{13}C . Quant à la partie bleue à m/z 317 et m/z 318, elle correspond à la contribution de la ZEN naturelle dans les spectres des mélanges ZEN naturelle et ZEN 10%- ^{13}C .

Normalement l'aire du pic à m/z 320 est constante avec ou sans ajout de ZEN ^{12}C . Si ce n'est pas le cas, il est nécessaire de normaliser les aires des autres pics par l'aire du pic à m/z 320. Ainsi, les calculs suivants permettent d'accéder à la concentration de la ZEN ^{13}C :

$$\text{Aire totale}^1 (\text{ZEN } ^{13}\text{C} + a \text{ ZEN } ^{12}\text{C}) - \text{Aire totale}^2 (\text{ZEN } ^{13}\text{C}) = \text{Aire normalisée de a ZEN } ^{12}\text{C}$$

$$\text{Aire normalisée de a ZEN } ^{12}\text{C} \leftrightarrow a$$

$$\text{Aire c ZEN } ^{13}\text{C} \leftrightarrow c$$

I-1.2. Résultats

Deux échantillons de ZEN 10%- ^{13}C ont été dosés à l'aide de la technique des ajouts dosés précédemment détaillée : un échantillon brut noté « brut 1 » et l'autre « brut 2 ».

¹ normalisée sur l'aire du pic 320 de la ZEN ^{13}C

² normalisée sur l'aire du pic 320 de la ZEN ^{13}C

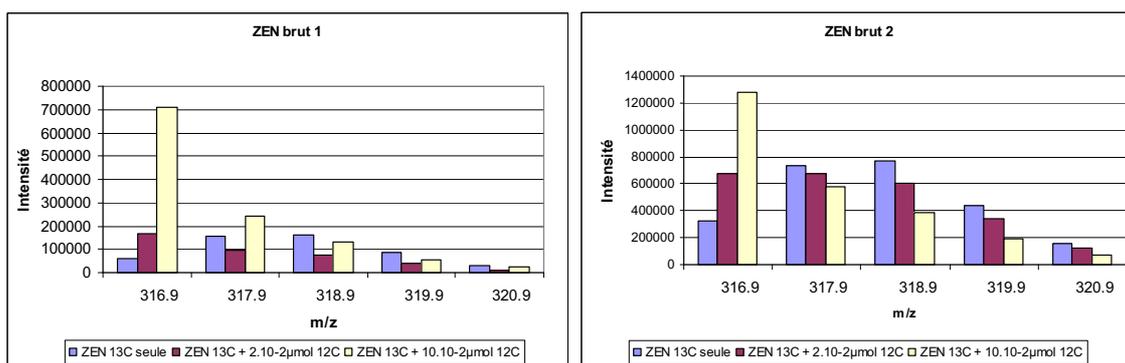


Figure V.4 : Spectres de masse de la ZEN 10%- ^{13}C brut 1 (gauche) et brut 2 (droite) avec et sans ajout de ZEN ^{12}C .

Le spectre de chaque extrait brut a été réalisé (en bleu), ainsi que le spectre du mélange de l'extrait brut avec un ajout de 0,02 μM de ZEN ^{12}C (rouge) et le spectre du mélange de l'extrait brut avec un ajout de 0,1 μM de ZEN ^{12}C (jaune).

Il s'est avéré préférable de normaliser ces spectres sur le pic à m/z 320. En effet quelle que soit la quantité de ZEN ^{12}C rajoutée, l'intensité du pic à m/z 320 ne doit pas varier car la contribution de la ZEN ^{12}C au pic m/z 320 est négligeable (Figure V.2).

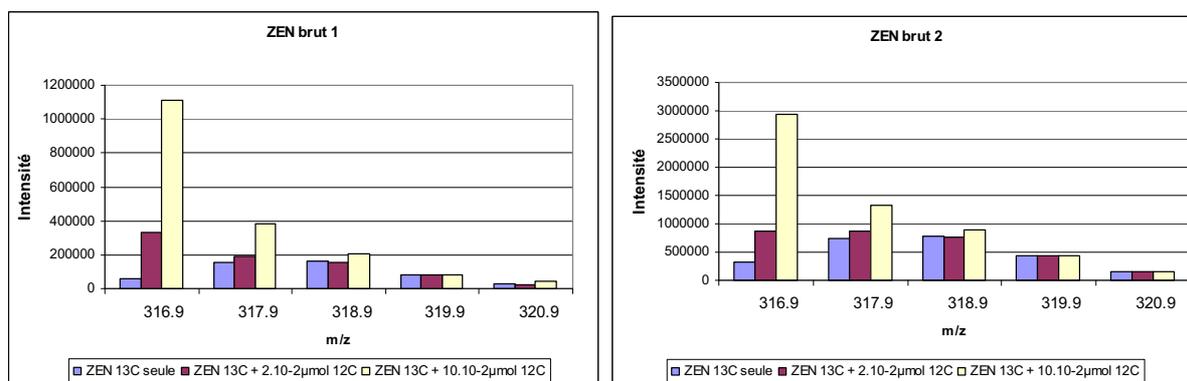


Figure V.5 : Spectres de masse normalisés de la ZEN 10%- ^{13}C brut 1 (gauche) et brut 2 (droite) avec et sans ajout de ZEN ^{12}C . Le spectre de chaque extrait brut a été réalisé (en bleu).

Le spectre du mélange de l'extrait brut avec un ajout de 0,02 μM de ZEN ^{12}C (rouge) et le spectre du mélange de l'extrait brut avec un ajout de 0,1 μM de ZEN ^{12}C (jaune) ont été normalisés en ajustant l'intensité du pic m/z 320 sur l'intensité du pic m/z 320 du spectre de la ZEN enrichie à 10%- ^{13}C .

Avec une gamme de concentrations en ZEN ^{12}C (10 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 500 μM), nous obtenons la courbe d'étalonnage de l'aire du signal UV en fonction de la concentration (Figure V.6).

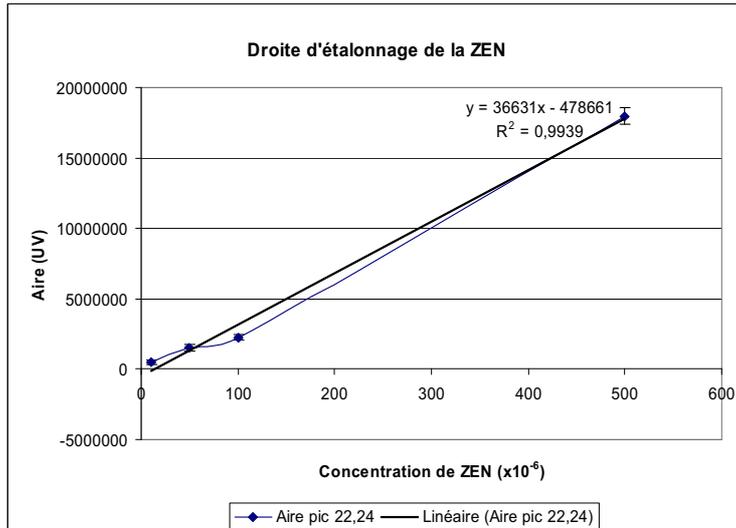


Figure V.6 : Droite d'étalonnage de la ZEN ¹²C commerciale (5-500 μ M). L'aire reportée est l'aire du signal UV absorbant à 280 nm. Le temps de rétention de la ZEN était de 22,2 minutes avec les conditions d'élution rappelées dans le Chapitre VI.

En reportant sur cette courbe les aires des signaux UV des échantillons ¹³C 1 et 2, il est possible de retrouver les concentrations inconnues des deux échantillons :

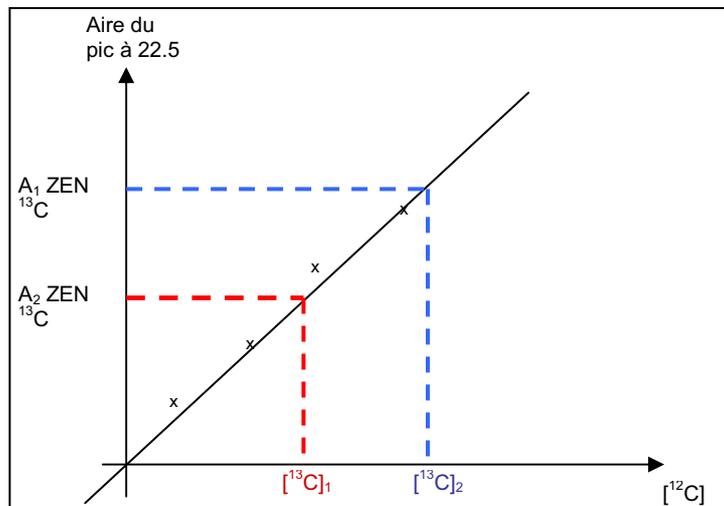


Figure V.7 : Dosage de la ZEN 10%- ¹³C contenue dans les solutions brutes 1 et 2, avec une droite d'étalonnage en ZEN ¹²C.

Nous avons également vérifié le dosage par la méthode dite des ajouts dosés par HPLC-UV le principe est le même que précédemment, si ce n'est que la courbe est décalée :

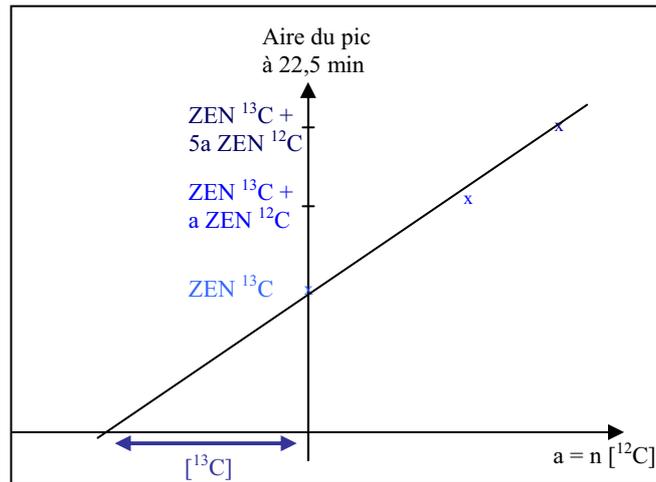


Figure V.8 : Illustration du dosage de la ZEN 10%- ^{13}C par la méthode des ajouts dosés.

Les résultats des deux méthodes de dosage, MS avec ajouts dosés (AD), et HPLC avec et sans ajouts dosés, sont résumés dans le Tableau V.1 :

Tableau V.1 : Détermination des concentrations de ZEN 10%- ^{13}C à partir de la solution avec ou sans ajout de ZEN ^{12}C . Les deux techniques analytiques utilisées ici sont la spectrométrie de masse et l'HPLC-UV (280 nm).

Concentration de ZEN ^{13}C (μM)	Déterminée par MS à partir de l'AD de 0,02 μM de ZEN ^{12}C	Déterminée par MS à partir de l'AD de 0,1 μM de ZEN ^{12}C	Déterminée par HPLC à partir des AD de ZEN ^{12}C	Déterminée par HPLC directement sans AD
ZEN ^{13}C (1)	868 \pm 95	943 \pm 72	911 \pm 49	892 \pm 43
ZEN ^{13}C (2)	381 \pm 57	367 \pm 31	396 \pm 23	369 \pm 19

I-1.3. Conclusion

Qu'il s'agisse d'un dosage par ajouts dosés ou d'un dosage direct par HPLC, la quantité de ZEN déterminée dans les extraits 1 et 2 est de l'ordre de 0,9 mM et 0,4 mM, respectivement. Cet exemple montre la pertinence d'utiliser un standard interne enrichi au ^{13}C par rapport aux ajouts dosés d'un standard interne naturel. L'utilisation d'un SI ^{13}C permet, en un seul point, de déterminer la concentration de l'analyte (ici la ZEN), même si ce dernier est faiblement concentré et sans étapes lourdes de purification ou d'extraction.

I-2. Dosage de la ZEN naturelle contenue dans des extraits d'animaux traités (foie, plasma, urine)

Dans le cadre de sa thèse, Radu Duca a été amené à traiter des animaux (rats et poulets) à la ZEN, au phénobarbital voire aux deux produits conjointement. De ces traitements, il a

récupéré différents types d'extraits biologiques (urine, foie, plasma, muscles, etc.). Ce matériel biologique était donc l'occasion de tester l'utilisation comme standard interne de la ZEN enrichie au ¹³C afin de déterminer les quantités de ZEN retrouvées dans certains de ces extraits biologiques (plasma, foie, urines).

I-2.1. Matériel et méthodes : détails des traitements

- Traitements couplés des rats

Trois rats de 200 g ont été utilisés par traitement. Les différents traitements administrés ont été les suivants :

<i>Composé administré</i>	<i>Traitement intra péritonéal</i>	
Contrôle	NaCl 9‰ 1ml / jour	3 jours
Puis huile	Huile - 0.5 ml/ jour	3h-1 jour
Phenobarbitone Sel de Sodium (PB)	80 mg/kg rat i.p. NaCl 9‰ / jour	3 jours
Puis ZEN (PB-ZEN)	25 mg/ kg rat i.p huile / jour	3h-1 jour

L'échantillonnage a été fait de la manière suivante :

<i>Nom du lot</i>	<i>Traitement oral</i>	<i>Échantillonnage après l'administration de Zen</i>
Contrôle- ZEN 3 h	Contrôle pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	3 heures
Contrôle- ZEN 6 h	Contrôle pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	6 heures
Contrôle-ZEN 10 h	Contrôle pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	10 heures
Contrôle- ZEN 24 h	Contrôle pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	24 heures
Contrôle	Contrôle pendant 3 jours	24h après l'injection d'huile
PB-ZEN 3 h	PB pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	3 heures
PB-ZEN 6 h	PB pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	6 heures
PB-ZEN 10 h	PB pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	10 heures
PB-ZEN 24 h	PB pendant 3 jours et Zen le 4 ^e jour	24 heures
PB-Contrôle	PB pendant 3 jours	24h après l'injection d'huile

- Traitements couplés des poulets

Cinq poulets Leghorn de deux semaines d'âge ont été utilisés par traitement de trois jours :

<i>Nom du lot</i>	<i>Traitement intra-peritoneal</i>
Contrôle	NaCl 9‰ – 1 ml / jour
Contrôle- ZEN (24h)	NaCl 9‰ – 1 ml / jour – 3 jours 25 mg/ kg poulet i.p. huile / jour – 1 jour
PB-ZEN (24h)	80 mg/kg poulet i.p. NaCl 9‰ / jour – 3 jours 25 mg/ kg poulet i.p. huile / jour – 1 jour

- Détails des post-traitements des extraits biologiques :

Nous avons sélectionné les plasmas et la fraction S9¹ du foie des poulets et des rats. Pour les purifications et les traitements des échantillons, nous avons suivi le protocole indiqué dans l'article de Songsermsakul (Songsermsakul *et al.* 2006).

Plus précisément, les échantillons dosés ont été : C-ZEN 3 h pour S9 de rat, C-ZEN 3 h et 6 h du plasma de rat, PB-ZEN 24 h et C-ZEN 3 j de plasma de poulet. 10 μM de standard interne (ZEN 81%-¹³C) ont alors été introduits dans chacun de ces derniers échantillons avant toute étape de purification ou de concentration.

Les analyses ont été limitées à deux points par mesure car nous ne disposons pas de suffisamment de matériel biologique pour certains extraits.

I-2.2. Résultats du dosage de la ZEN contenue dans les échantillons biologiques

Les dosages ont été faits par couplage LC-MS dans les conditions standards de gradient et d'ionisation :

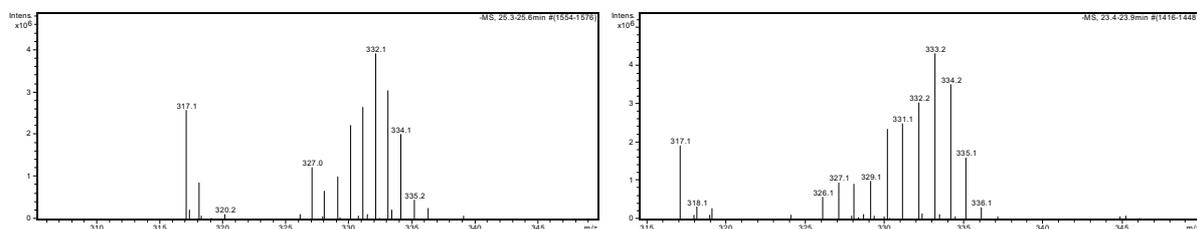


Figure V.9: Exemples de spectres de masse des échantillons de plasma de rat C-ZEN 3 h (gauche) et de S9 de rat C-ZEN 3 h (droite) contenant le standard interne.

Le massif isotopique entre m/z 327 et m/z 336 correspond au standard interne de ZEN 81%-¹³C. Le signal à m/z 317 correspond à la ZEN naturelle présente dans l'échantillon biologique.

Comme nous pouvons le constater sur les spectres de masse de la Figure V.9, le massif isotopique témoigne de la présence du standard interne introduit. Dans les deux cas le signal du standard interne et celui de la ZEN naturelle contenue dans l'échantillon (m/z 317) sont disjoints ce qui nous permet de calculer aisément la quantité de ZEN initiale en faisant le ratio des intensités des deux signaux :

¹ S9 : surnageant résultant de la centrifugation à 9000g d'un homogénat de foie de rat. Ce surnageant contient le cytosol ainsi que le réticulum endoplasmique et contient qualitativement et quantitativement les principales enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

Tableau V.2 : Dosage de ZEN dans des extraits biologiques de rat et de poulet ayant été traités à la ZEN et/ou aux barbituriques à l'aide de $10\ \mu\text{M}$ de ZEN $81\%\ ^{13}\text{C}$; (n= 2).

	[ZEN] (μM)
S9 (rat)	
C-ZEN 3h +50 nmoles ^{13}C	$1,4 \pm 0,2$
Plasma (rat)	
C-ZEN 3h +20 nmoles ^{13}C	$2,1 \pm 0,5$
C-ZEN 6h +10 nmoles ^{13}C	$1,5 \pm 0,3$
Plasma (poulet)	
PB-ZEN 24h + 20 nmoles ^{13}C	$0,2 \pm 0,04$
ZEN 3j + 20 nmoles ^{13}C	$0,4 \pm 0,08$

Les échantillons ayant tous été traités à la glucuronidase, les quantités de ZEN dosées correspondent aux quantités totales de ZEN libre dans les échantillons. En réalité une partie de cette ZEN était peut-être sous forme glucuronidée.

Nous nous sommes assurés par ailleurs de la linéarité du rapport des concentrations de ZEN ^{12}C et de ZEN ^{13}C dans un extrait biologique. Pour cela nous avons rajouté une quantité constante de ZEN $81\%\text{-}^{13}\text{C}$ ($10\ \mu\text{M}$) dans un extrait de plasma de poulet contrôle et une quantité croissante de ZEN ^{12}C (de $0,1$ à $10\ \mu\text{M}$). Une simple étape de purification sur colonne d'immuno-affinité (Cf Chapitre VI) a été pratiquée pour éliminer les protéines n'ayant pas été éliminées lors des centrifugations.

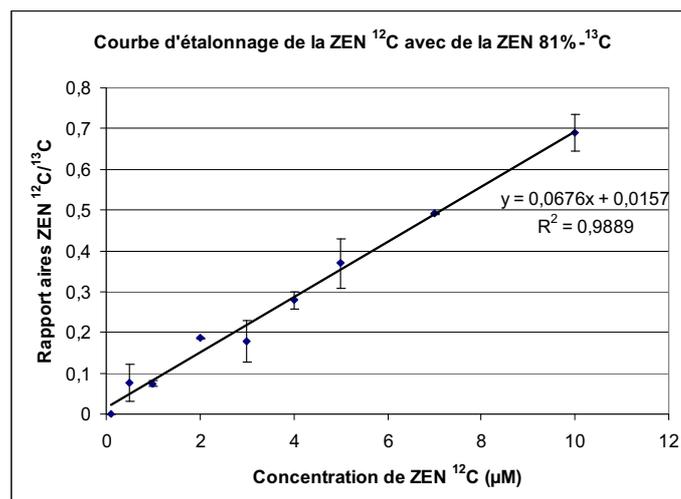


Figure V.10 : Rapport des aires des massifs isotopiques de la ZEN ^{12}C par la ZEN $81\%\text{-}^{13}\text{C}$ dans des extraits de plasma de poulet. La quantité de ZEN $81\%\text{-}^{13}\text{C}$ est constante ($10\ \mu\text{M}$) et la quantité de ZEN ^{12}C croît de $0,1$ à $10\ \mu\text{M}$. (n=2).

Comme le montre la Figure V.10, le rapport des aires de la ZEN ¹²C et des aires du massif isotopique de la ZEN 81%-¹³C est proportionnel à la quantité de ZEN ¹²C introduite dans l'extrait. Ceci nous assure la linéarité et nous permet de valider les dosages faits à partir de ZEN 81%-¹³C. L'effet matrice ne gêne pas la quantification et ce quelle que soit la quantité de ZEN naturelle présente dans l'échantillon à doser.

I-2.3. Conclusions

L'exemple de ce dosage nous permet d'affirmer que l'utilisation d'un standard interne enrichi au ¹³C est une technique fiable pour des analyses quantitatives.

Par ailleurs, ce principe peut être mis en œuvre d'un point de vue qualitatif pour des études de métabolisme ou de transport puisque nous avons montré que la présence d'un massif isotopique peut faciliter l'identification d'un métabolite.

II. Dosage d'acide mycophénolique

Une série de plasmas humains de patients ayant été traités à l'acide mycophénolique nous ont été fournis¹ afin de doser les quantités d'acide mycophénolique et d'acide mycophénolique glucuronidé qu'ils contenaient. Pour cela, nous avons utilisé de l'acide mycophénolique enrichi en ¹³C comme standard interne. Ceci nous permet encore une fois, d'illustrer l'intérêt de l'usage de standards internes enrichis aux isotopes stables pour des dosages quantitatifs à partir d'extraits biologiques contaminés.

II-1 Matériel et méthode

Nous avons traité 6 échantillons de plasmas humains (5 plasmas de patients traités après une greffe et un plasma témoin) de manière similaire : 250 µL de plasma ont été prélevés, auxquels 750 µL d'eau, 990 µL d'ACN et 10 µL d'AMP 37%-¹³C à 10⁻³ M pur ont été ajoutés.

Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000 tr.min⁻¹ pour éliminer les protéines, les échantillons ont été purifiés et extraits sur SPE avec une solution d'H₂O/ACN 50:50 (*Cf* Chapitre VI) puis portés à sec et enfin repris dans une solution d'H₂O/ACN 50:50. Ce dernier

¹ Service de Biochimie de l'hôpital Paul Brousse.

est analysé par couplage HPLC/MS avec la méthode classique. Nous nous sommes intéressés non seulement à l'AMP, mais aussi à l'AMP-glu. Ces deux composés ont été dosés en utilisant le SI d'AMP 37%-¹³C.

II-2. Résultats

L'analyse des spectres de masse nous permet de quantifier l'acide mycophénolique présent dans les extraits de plasmas humains (Figure V.11, Tableau V.3).

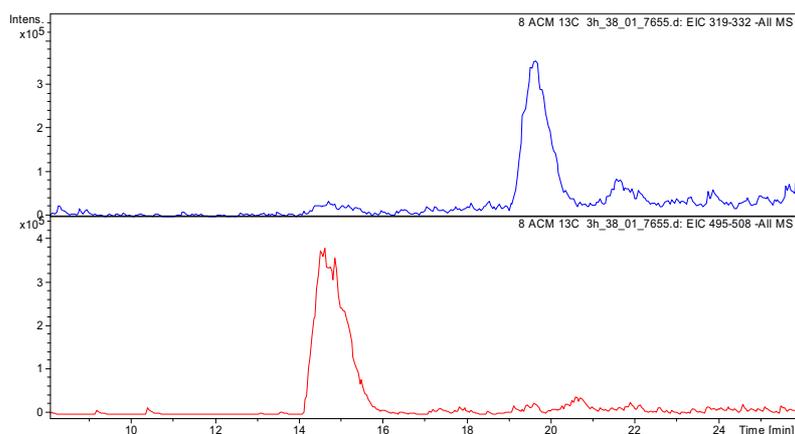


Figure V.11: Chromatogrammes de l'AMP (bleu) et de l'AMP-glu (rouge) à 280 nm.

La présence du massif isotopique entre m/z 321 et m/z 331 est due à l'introduction du standard interne enrichi à 37 % de ¹³C (Figure V.12).

Plasma	[AMP ¹² C] (μM)	[AMPglu] (μM)
1	18 ± 4	35 ± 42
2	31 ± 1	2 ± 2
3	109 ± 2	14 ± 16
4	59 ± 10	5 ± 2
5	8 ± 3	11 ± 10
Témoin	0 ± 0	0 ± 0

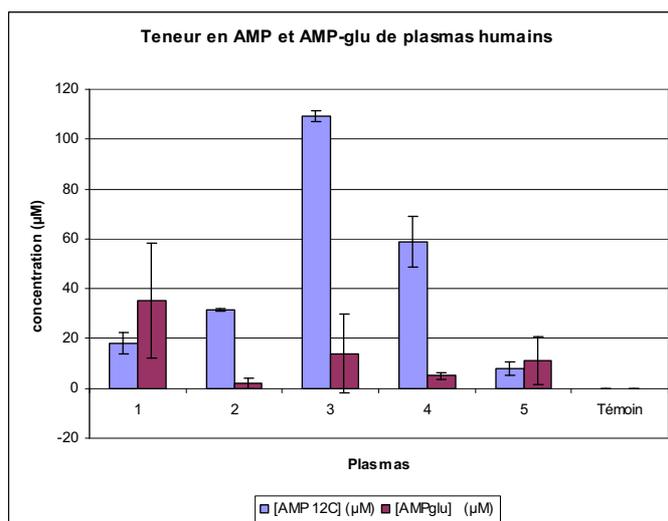


Tableau V.3 : Concentrations (μM) d'acide mycophénolique (RT = 19,8 min) et de son dérivé glucuronidé (RT = 14,8 min) dans les plasmas humains. La quantification est réalisée sur la surface des aires des signaux répondant aux massifs isotopique (319-332) pour l'acide mycophénolique et (495-508) pour le métabolite glucuro-conjugué.

La présence plus ou moins importante d'un pic à m/z 319 correspond à l'acide mycophénolique contenu dans les échantillons. Sachant que la quantité de standard interne introduite dans les échantillons avant le traitement de purification sur colonne Sepack était la même dans les 6 extraits (10 nano moles), le rapport relatif entre le massif isotopique et le pic à m/z 319 traduit une quantité initiale plus ou moins importante d'acide mycophénolique contenue dans les échantillons (Figure V.12).

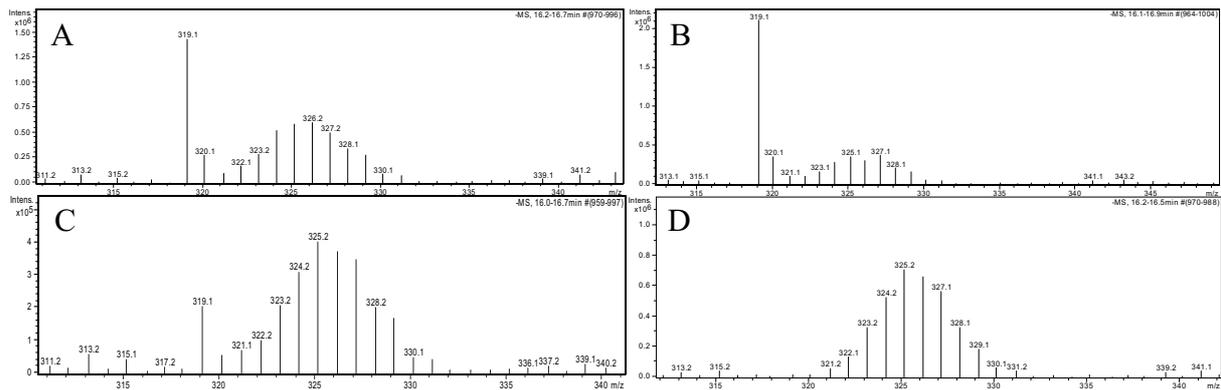


Figure V.12 : Spectres de masse d'AMP (RT = 19,8 min) contenu dans les échantillons de plasmas sanguins humains (A : plasma 1 ; B : plasma 4 ; C : plasma 5 ; D : plasma témoin). L'ionisation est en mode négatif (arrachement d'un proton).

Les calculs de la teneur en AMP (RT = 19,8 min) et en AMP-glu (RT = 14,8 min) ont été faits en utilisant le massif isotopique du standard interne d'AMP 37%-¹³C: par définition d'un standard interne, la quantité éventuellement « perdue » au cours des étapes de purification est proportionnelle à celle du produit dosé. Ceci nous permet de ramener la quantité restante d'AMP à doser à celle du standard interne initialement introduit. Ainsi, le rapport entre les aires des composés naturels contenus dans les échantillons (AMP et AMP-glu) et les aires du massif du SI, nous permet de déterminer les quantités initiales d'AMP et d'AMP-glu dans les plasmas avant purification sur SPE.

Afin de vérifier que nos dosages sont corrects, nous utilisons une gamme d'étalonnage d'acide mycophénolique de 5 à 100 μ M et calculons les concentrations d'acide mycophénolique et d'acide mycophénolique glucuronide dans les plasmas humains en reportant les intensités de leurs spectres de masse. La Figure V.13 illustre cette démarche pour l'échantillon de plasma numéroté 1.

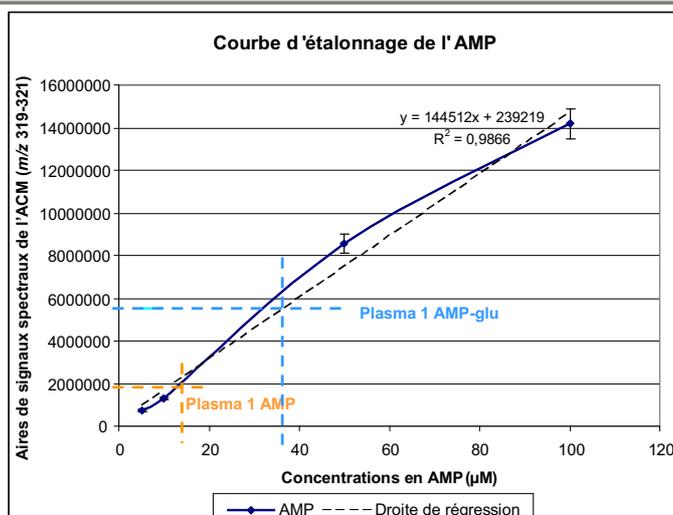


Figure V.13 : Courbe d'étalonnage de l'acide mycophénolique. La somme des aires des signaux spectraux de l'AMP naturel (m/z 319-321) a été calculée pour chaque concentration (5, 10, 50 et 100 µM) d'AMP. Les aires des signaux spectraux de l'AMP (orange) et de l'AMP-glu (bleu clair) contenus dans le plasma 1 ont été reportées afin de déterminer leur concentration.

On peut alors constater que les résultats sont en accord avec les calculs directs précédents utilisant un standard interne : la concentration d'AMP-glu trouvée avec la courbe d'étalonnage est voisine de 37 µM (vs 35 µM trouvée avec le SI), celle d'AMP est voisine de 13 µM (vs 18 µM trouvée avec le SI).

L'avantage de l'utilisation de standard interne par rapport à une gamme d'étalonnage est qu'il est inutile d'utiliser plusieurs concentrations de standard : une seule suffit, que l'on introduit au début des analyses dans les échantillons à doser. Par ailleurs un seul spectre de masse est nécessaire à la quantification.

II-3. Conclusions

Cet exemple montre l'intérêt et la fiabilité d'un standard interne enrichi en isotope stable pour des dosages en spectrométrie de masse alors que d'habitude le SI est un composé « seulement » chimiquement proche de la molécule à doser. Ici le SI est la même molécule.

III. Conclusions

Nous avons ici montré, à travers les exemples de la ZEN et de l'AMP, que l'usage d'un standard interne enrichi au ¹³C permet d'accéder à des grandeurs qualitatives comme quantitatives en une seule mesure spectrale. En effet, puisque les signaux de l'analyte et du

standard interne sont séparés, il devient inutile d'enregistrer le spectre de l'analyte seul afin de déterminer la contribution du standard comme c'est le cas en HPLC.

De plus, le standard interne enrichi en ^{13}C ayant un comportement identique à celui de l'analyte pendant les phases de purification et d'extraction, la seule connaissance de la quantité initiale de standard introduit permet d'accéder à la quantité initiale d'analyte sans craindre des pertes de matières.

CHAPITRE VI

METHODES EXPERIMENTALES

Les colonnes d'extraction C₁₈ en phase solide de Bond Elut provenaient de Varian (CA, Etats-Unis) et de chez Oasis (Waters, Milford, MA). Les colonnes d'immuno-affinité de ZEN (CIA) ZearaStar® ont été achetées au laboratoire Romer GMBH (Tulin, Autriche), spécialisé en diagnostique. Les composés chimiques suivants : zéaralénone, zéaralanone, α/β -zéaralenol, α/β -zéaralanol, NADPH, acétonitrile, α -naphtoflavone, Glucose-6-Phosphate, Glucuronidase-arylsulfatase, MgCl₂, furaffyline, tranlycypromine, ticlopidine, taxol, gemfibrozil, sulfaphenazole, quinidine, méthylpyrazole, chloroxazone, TAO et kétoconazole ont été achetés chez Sigma (St Louis, MOIS, Etats-Unis). Tous les réactifs ont été choisis avec la plus grande pureté disponible.

I. Incubations

I-1. Traitements des animaux et préparations des enzymes (Radu Duca)

Des rats mâles Sprague-Dawley (Iffa Credo, St Germain l'Arbresle, France) ont été stockés et traités selon la législation française dans un service autorisé par le ministère de l'agriculture. Ces rats au poids corporel moyen initial de 200 g ont été étudiés pendant 4 jours. Ils ont été alimentés à base d'un régime normalisé *ad libitum*.

Chaque jour de l'expérience, les animaux étaient traités par une injection intra-péritonéale, comme suit :

- a) les rats contrôles ont été traités avec 1 mL de tampon physiologique/jour pendant 3 jours puis le dernier jour avec 0,5 mL d'huile de maïs ;
- b) les rats contrôle-PB ont été traités avec 80 mg/kg *i.p* de sel de sodium phénobarbitone dans du tampon physiologique pendant 3 jours puis le dernier jour avec 0,5 mL d'huile de maïs ;
- c) les rats contrôle-ZEN (C-ZEN) ont été traités avec 1 mL/jour de tampon physiologique pendant 3 jours puis avec 25 mg/kg. *p.o* de zéaralénone dans 0,5 mL d'huile de maïs ;
- d) Les rats PB-ZEN ont été traités avec 80 mg/kg *i.p* de sel de sodium phénobarbitone dans du tampon physiologique pendant 3 jours puis un traitement *p.o.* de zéaralénone de 25 mg/kg dans l'huile de maïs.

Les animaux ont été maintenus dans des cages métaboliques pour la collection d'urine après les traitements de ZEN. Les animaux ont été sacrifiés à des temps déterminés et leur foie a été prélevé pour les préparations microsomaux.

Les microsomes ont été préparés à partir du tissu dégelé de foie en utilisant l'ultracentrifugation selon la méthode décrite par Guengerich (Guengerich 1994). La

préparation granuleuse microsomale résultante a été suspendue dans une solution de tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,4) avec 20% de glycérol, puis gelée dans l'azote liquide et stockée à - 80°C jusqu'à utilisation.

I-2. Provenance des CYP

Des microsomes de foie de porc, de chien, de lapin, de souris, de rat et de singe de type Cynomolgus ont été achetés chez Gentest (BD Biosciences, NJ, États-Unis). Des lots de foies humains de femme H1500 et d'homme H1500 ont été achetées chez Xenotech (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Un lot de microsomes humains de foie de sexe non spécifié (HL-Mix14) provenait de Gentest.

Les formes exprimées humaines CYP (bactosomes) ont été fournies par Cypex (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France).

I-3. Protocole d'incubations de ZEN avec des microsomes hépatiques ou des formes exprimées de CYPs

I-3.1. Incubations de ZEN à pH 7,4 ou 4,5

Des CYPs exprimés humains ou des solutions microsomales (1 μ M de concentration finale) sont incubés avec un système générateur de NADPH (1 mM NADP + 10 mM Glucose-6-Phosphate, 1 UI G6PDH), 100 μ M de $MgCl_2$ et 50 μ M de zéaralénone pendant 30 minutes à 37°C dans une solution tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,4). Des incubations contrôle sans microsomes ou sans système générateur de NADPH sont effectuées en parallèle. Les incubations sont arrêtées par l'addition du même volume d'acétonitrile froid et stockées pendant quelques minutes à -20°C. Après centrifugation à 7500 g pendant 10 minutes, les surnageants sont stockés à -20°C jusqu'à analyse.

Le protocole est identique à pH 4,5 en remplaçant le tampon phosphate par une solution de tampon citrate 0,1 M à pH 4,5. Le système générateur est alors remplacé par du NADPH directement.

I-3.2. Incubations de ZEN avec des inhibiteurs spécifiques de CYP humains

Des incubations en présence des microsomes de rats traités au phénobarbital (rats PB), de 50 μ M de ZEN et de 20 μ M d'inhibiteurs de CYP humains (excepté 2 μ M pour le kétoconazole) sont effectuées pendant 30 minutes en suivant le même mode opératoire.

I-3.3. Incubations de ZEN ou d'AMP à pH 7,4 avec de l'UDPGA

Des microsomes de rats PB (5 mg/mL protéines microsomales) sont incubés avec 0,32 mg/mL de substrat (dans 2% de DMSO final), 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de 1,4-saccharolactone, 50 μ g/mL d'alaméthicine, 1 mM de dithiotreitol et 10 mM de sel d'acide uridine-diphosphate glucuronique (UDPGA) pendant 1 à 3 heures à 37°C dans 1 mL de solution tampon phosphate à 0,1 M (pH 7,4) et de 2,5% d'albumine de sérum de bœuf (BSA). Des incubations contrôles sans microsomes ou sans UDPGA sont effectuées en parallèle. Les incubations sont stoppées par l'addition de 1 mL d'un mélange froid de méthanol d'acide formique (100 : 1). Les incubations sont alors stockées pendant quelques minutes à -20°C puis à 4°C. Après centrifugation à 10 000 t/mn pendant 10 minutes, les surnageants sont évaporés à sec et reconstitués dans 500 μ L d'eau/d'acétonitrile (50/50, v/v).

II. Purifications-extractions

II-1. Extraction de la ZEN d'échantillons biologiques

Le procédé d'extraction de la ZEN et de ses métabolites a été adapté de (Songsermsakul *et al.* 2006).

II-1.1. Échantillon d'urine

L'urine de rat (1 mL) est mélangée à 5 mL d'une solution tampon d'acétate d'ammonium à 50 mM (pH 4,8). Cette solution est incubée pendant 15 h à 37°C avec 20 μ L d'une solution de glucuronidase/arylsulfatase. Après ajustement du pH à 4 avec de l'acide acétique froid, la solution est purifiée sur une colonne d'extraction en phase solide Sep-Pac® C₁₈ 100 mg, et éluée avec 1,5 mL de MeOH. Cet éluat est mélangé à 20 mL de la solution tampon phosphate à pH 7,4 et chargé sur la colonne d'immuno-affinité, puis lavé avec 15 mL d'eau et enfin élué

avec 1,5 mL d'ACN. Après évaporation sous vide, le résidu est reconstitué dans 150 μ L de phase mobile. 20 μ L de cette solution sont injectés dans le système HPLC-MS.

II-1.2. Échantillon de plasma

Un millilitre de plasma est mélangé à 5 mL d'une solution tampon d'acétate d'ammonium à 0,05 M pH 4,8. Cette solution est incubée pendant 15 h à 37°C avec 25 μ L de la solution de glucuronidase/arylsulfatase avant de la mélanger à 6 mL de solution tampon phosphate et d'ajuster le pH à 7,4 avec une solution de NaOH à 1 M. Après centrifugation à 2500 g pendant 10 minutes la partie claire est chargée sur une colonne d'immuno-affinité. Toutes les étapes suivantes sont effectuées comme décrit ci-dessus pour le traitement des échantillons d'urine.

II-1.3. Échantillon de foie

250 μ g de foie sont mélangés à 6 mL de MeOH/H₂O (50/50, v/v). Après centrifugation de 10 minutes à 4000 g, 5 mL de surnageant sont mélangés à 20 mL de la solution tampon d'acétate d'ammonium 50 mM pH 4,8. Cette solution est incubée pendant 15 h à 37°C avec le 80 μ L de la solution de glucuronidase/arylsulfatase. Toutes les étapes suivantes sont effectuées comme décrit ci-dessus pour le traitement des échantillons d'urine et de plasma.

II-2. Extraction sur phase solide de la ZEN à partir de matrices végétales

Un procédé d'extraction en phase solide est employé pour la purification des solutions de zéaralénone ¹³C. Les solutions brutes sont diluées au tiers avec de l'eau puis passées sur une cartouche d'extraction en phase solide C₁₈ Oasis 10 mg (Waters, Milford, MA) préalablement activée avec de l'acétonitrile et de l'eau. La cartouche est rincée avec 2 mL d'eau/acétonitrile (90/10, v/v). La ZEN est alors éluée avec 1 mL d'acétonitrile. Les extraits sont évaporés à sec et reconstitués dans 150 μ L d'eau/d'acétonitrile (50/50, v/v). Le rendement d'extraction est alors de 71%±5% et la pureté (déterminée à partir du spectre IR par le logiciel de traitement des données LCSolutions développé par Shimadzu) est alors de l'ordre de 67%±5%.

Une étape supplémentaire de purification a été réalisée pour la ZEN enrichie à 81%-¹³C utilisée dans des incubations à pH 7,4 pour la formation d'OH-ZEN ¹³C (étude de l'effet isotopique). La solution éluée sur la colonne d'extraction en phase solide (1 mL) a été mélangée à 20 mL de la solution tampon phosphate à pH 7,4 puis chargée sur la colonne

d'immuno-affinité (Romer, Autriche). Cette dernière est alors lavée avec 15 mL d'eau puis éluée avec 1,5 mL d'acétonitrile. Après évaporation sous vide, le résidu a été reconstitué dans 20 μ L d'eau/d'acétonitrile (50/50, v/v). Le rendement d'extraction après les deux étapes, est alors de 45% \pm 3% et la pureté (déterminée à partir du spectre IR par le logiciel de traitement des données LCSolutions développé par Shimadzu) est alors de l'ordre de 90% \pm 5%.

II-3. Purification de la ZEN glucuronide et de solutions brutes de ZEN ¹³C par HPLC semi-préparative

L'HPLC (Hitachi, Tokyo, Japon) est équipée d'une colonne Kromasil C₁₈ 5 μ m de dimensions 250 \times 7,8 mm (Interchim, France), d'un détecteur UV monochromatique et d'un chromatointégrateur (Hitachi, Tokyo, Japon). Les phases mobiles utilisées sont composées de 10 mM d'acétate d'ammonium dans l'eau/acétonitrile (90/10 v/v) pour le solvant A et d'eau/acétonitrile (10/90 v/v) pour le solvant B. 500 μ L des solutions à purifier sont injectés dans l'HPLC semi-préparative avec un gradient de solvant démarrant à 10% de solvant B pendant 2 minutes, suivi d'un gradient linéaire jusqu'à 80% de B jusqu'à 22 minutes. Après une élution isocratique pendant 2 minutes, le gradient revient à 10% de B en 2 minutes. Le débit de colonne est de 2 mL/min. Les pics sont collectés manuellement et les fractions récupérées sont finalement évaporées à sec sous vide. Les extraits secs sont maintenus à -20°C jusqu'à utilisation puis repris dans une solution d'eau/acétonitrile 50/50. Les rendements d'extraction pour les solutions de ZEN brute sont alors très faibles (moins de 50%) en raison de phénomènes d'absorption de la ZEN sur les parois plastiques et/ou verre du matériel utilisé. En revanche la pureté obtenue est de l'ordre de 95 \pm 3%.

III. Analyse de la ZEN et de ses métabolites par couplage HPLC-MS

Le système HPLC utilisé dans le couplage LC-MS est composé d'un système 1100 LC de séries, (Agilent, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse à piège ionique (Esquire HCT) employant une interface ESI fonctionnant en mode positif ou négatif (Bruker Daltonics, mA, Etats-Unis).

Le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse de haute résolution est un JMS SX 102A (Jeol, Tokyo, Japon). Quant au chromatographe liquide couplé au spectromètre de masse de haute résolution, c'est un LTQ ORBITRAP (électrons thermo, USA).

III-1. GC-MS (GC-HRMS), Laberca, Nantes.

Cette technique analytique a été utilisée pour la détermination structurale de l'OH-ZEN majoritairement formé dans des incubations de ZEN avec des microsomes de rats PB. Ce travail expérimental a été mené par Fabrice Monteau du LABERCA (Laboratoire d'Étude des Résidus et des Contaminants dans les aliments) de Nantes. Les conditions de dérivations en balayage complet en mode d'impact électronique étaient les suivantes :

- Pour la dérivation au TMS, 20 µL d'un mélange de MSTFA/TMIS de Fluka- USA (1000 : 5, v/v) ont été additionnés aux échantillons secs et chauffés pendant 30 minutes à 60°C. 2 µL ont été injectés dans le chromatographe en phase gazeuse. La colonne GC (JW, USA) utilisée était une DB5MS de dimension 30 m (longueur) x 0,25 mm (diamètre) et d'épaisseur de film 0,25 µm. Les conditions étaient 120° C pendant 2 minutes jusqu'à 300°C à 10°C/min.

- Pour la dérivation méthylboronique, la quantité nécessaire de triméthylboroxine (Fluka - USA) a été diluée dans l'acétate d'éthyl pour obtenir une solution à 2% (\pm 0,2) de triméthylboroxine (v/v) ; 20 µL ont été ajoutés aux échantillons secs et chauffés pendant 60 minutes à 45°C. Le résidu a été injecté dans des conditions semblables à celles indiquées ci-dessus.

III-2. LC-MS

III-2.1. Trappe ionique (CEA/IBiTec-S/SIMOPRO)

Des analyses quantitatives et qualitatives de la ZEN et de ses métabolites ont été effectuées au CEA en utilisant le couplage LC-MS. Les caractéristiques de ce couplage en utilisation automatique d'injections des échantillons, étaient les suivantes :

- une colonne Kromasil 5 µm C₁₈ de 150 × 2 mm (Interchim, France) ;
- le signal UV est enregistré avant injection dans le spectrophotomètre de masse par une source ESI (330°C, tension de sonde 4500 V, pression de gaz totale maintenue à 40 psi et débit de gaz sec 9 L/min) fonctionnant en mode négatif avec un potentiel de focale réglé à 3,50 kilovolts et un temps de saturation d'acquisition de 100 ms ;
- la phase mobile (0,2 mL/min) est composée de 10 mM d'acétate d'ammonium dans l'eau/acétonitrile (90/10 v/v) pour le solvant A et d'eau/acétonitrile (10/90 v/v) pour le solvant B. Le profil d'élution commence à 10% de solvant B pendant 2 minutes, suivi d'un gradient linéaire jusqu'à 80% de solvant B jusqu'à 22 minutes. Après une période

isocratique pendant 2 minutes, le système retourne aux conditions initiales en 2 minutes (Figure VI.1).

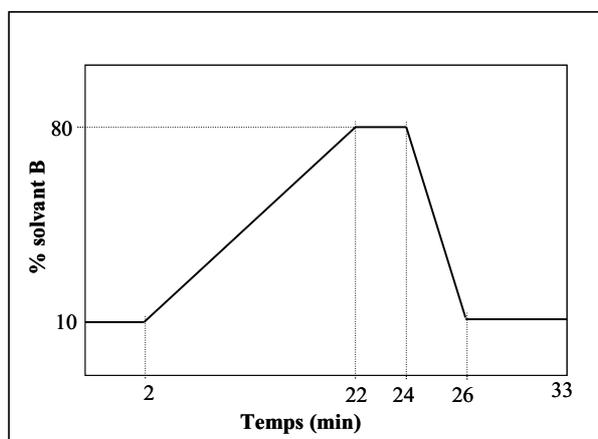


Figure VI.1 : Gradient d'élution pour les analyses LC-MS sur le spectromètre de masse Bruker (muni d'une trappe ionique).

Solvant A : 10 mM d'acétate d'ammonium dans l'eau/acétonitrile (90/10 v/v) ; solvant B : eau/acétonitrile (10/90 v/v).

Un volume de 20 μL est injecté dans le système chromatographique.

Des spectres ESI-MS ont été acquis en mode d'ionisation négative dans une gamme m/z 200-500 avec une masse cible de m/z 320 en mode centroïde et un temps d'accumulation maximal dans la trappe de 100 ms.

Pour certaines analyses, les spectres ont été acquis en utilisant la fonction de « Auto MS³ » qui incluait un spectre de masse complet et les spectres MS² et MS³ de l'ion majoritaire. L'ion le plus intense détecté dans l'intervalle m/z 200-500 pendant le balayage est alors fragmenté (MS²) puis l'ion le plus intense formé (ion parent MS² exclu) déclenche le MS³. Les paramètres d'acquisition de MSⁿ avaient une largeur d'isolement de 2 m/z , une énergie de collision de 30% et un temps d'activation de 40 ms. Les optimisations des signaux MS et MS² de la ZEN et de ses métabolites ont été faites en utilisant la ZEN. L'acquisition de données et le traitement ont été effectués en utilisant les logiciels fournis par Bruker.

III-2.2. LC- LTQ ORBITRAP

Un système LC Surveyor (Thermo-Fisher, Les Ulis, France) a été utilisé pour l'introduction et la séparation d'échantillon. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne XTerra MS C₁₈ 5 μm , 150 x 2,1 mm (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) équipée d'un préfiltre en ligne (Interchim, Montluçon, France). Le système de solvants est composé de

0,1% d'acide formique dans l'eau comme solvant A et de 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile comme solvant B. Cette méthode a été utilisée uniquement pour l'analyse des OH-ZENs formés dans une incubation de ZEN en présence de microsomes de rats PB. Ce travail expérimental a été mené par Erwan Werner, du SPI (Service de pharmacologie et d'immuno analyse) du CEA de Saclay.

Les OH-ZEN ont été élués à partir de 0% de solvant B pendant 5 minutes, suivi d'un gradient linéaire jusqu'à 100% de solvant B pendant 40 minutes. Après une élution isocratique pendant 5 minutes, le gradient retombe à 0% de solvant B en 1 minute pour permettre la re-équilibration de la colonne pendant les 10 minutes suivantes (Figure VI.2). Le débit de colonne était de 0,2 mL/min et la température de plateau récepteur et de colonne ont été maintenues respectivement à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ et $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Un volume de 20 μL a été injecté dans le système chromatographique.

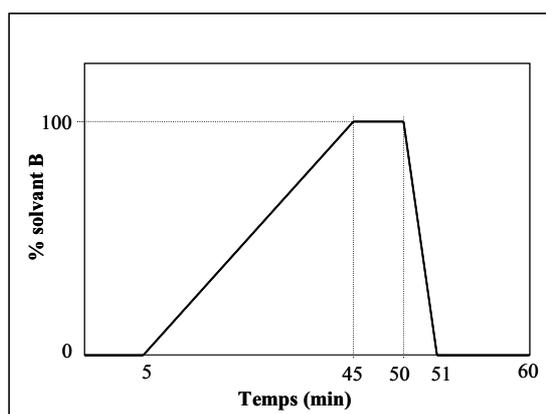


Figure VI.2 : Gradient d'élution pour les analyses des OH-ZEN sur Orbitrap.

Solvant A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; solvant B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile.

Des spectres ESI-MS ont été acquis en mode d'ionisation négative dans une gamme 75-1000 Th avec une puissance de résolution de masse réglée à 60 000 ($M/\Delta M$ à FWHM) en mode centroïde. Le gaz de gaine était à 50 (unités arbitraires), le gaz auxiliaire à 10 (unités arbitraires) et la température du capillaire à 275°C . La tension de source et la tension d'objectif de tube étaient respectivement à 3500 V et à -100 V. Des paramètres de Lens ont été optimisés en utilisant une solution d'air contenant le glucuronide de testostérone, l'aldostérone, le sulfate de DHEA, et l'acide adipique à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans un mélange méthanol/eau (50/50), infusés à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les débits de gaz ont été alors optimisés avec les mêmes composés mais avec un débit HPLC de 0,2 mL/min. Le calibrage de l'Orbitrap a été effectué en utilisant le mélange de calibrage du Thermo-Fisher (Les Ulis, France), qui comprenait le MRFA et la caféine.

Les spectres ont été acquis en utilisant la fonction de balayage qui incluait un spectre de masse complet à une résolution de masse de 30 000 et deux spectres (MS^2 et MS^3) acquis avec une résolution de masse réglée à 7 500. L'ion le plus intense détecté dans l'intervalle 332,63 – 333,63 Th pendant le balayage a été fragmenté (MS^2) puis l'ion le plus intense formé (ion parent MS^2 exclu) a déclenché le MS^3 . Le comptage Microscan a été fixé à l'unité. Les paramètres d'acquisition de MS^n avaient une largeur d'isolement de 1 Th, une énergie de collision de 35% et un temps d'activation de 30 ms avec l'activation large bande.

Toutes les données ont été traitées en utilisant Qualbrowser® (Thermo-Fisher, Les Ulis, France) et son générateur de formules chimiques a été utilisé pour fournir les compositions élémentaires.

IV. Mesure du transport de la ZEN sur Caco2

Ces études ont été menées à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon, sous la direction de Sylvaine Lecoeur et avec la participation de Jonathan Tep qui a réalisé les études de cytotoxicité.

IV-1. Transport

Cinq plaques de culture de 24 puits sur insert ont été réalisées ; le volume apical introduit est de 200 μ L et le volume basal est de 1000 μ L d'HBSS (milieu de transport riche en glucose : 1 g/L). Chaque condition est répliquée trois fois ($n = 3$) et l'application des solutions se fait toujours sur le pôle apical de l'insert.

- Plaque 1 (8 conditions, $n=3$) : étude d'une solution de ZEN ^{12}C . 7 concentrations sont testées (0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 1 ; 2 et 10 μ M) + un témoin (milieu de transport) ;
- Plaque 2 (8 conditions, $n=3$) : étude de la solution brute 15 (ZEN~20 μ M). La concentration de ZEN est maintenue constante (10 μ M) en complétant avec de la ZEN ^{12}C commerciale. 7 concentrations ^{13}C sont testées (0 ; 0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 1 et 2 μ M) + un témoin (milieu de transport) ;
- Plaque 3 (8 conditions, $n=3$) : étude de la solution brute 15 (ZEN~20 μ M). La concentration de ZEN varie. 7 concentrations de ZEN sont testées (0,01 ; 0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 1 et 2 μ M) + un témoin (milieu de transport) ;

- Plaque 4 (8 conditions, n=3) : étude de la solution brute 1 (ZEN~200 μM). 7 concentrations sont testées (0,01 ; 0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 1 μM) + un témoin (milieu de transport) ;
- Plaque 5 (8 conditions, n=3) : étude de la solution de blé témoin, avec et sans ZEN ^{12}C ($C_f = 10 \mu\text{M}$). 4 concentrations sont testées (1/100 ; 2/100 ; 4/100 ; 10/100).

IV-2. Cytotoxicité

La mesure de la cytotoxicité de la ZEN sur les cellules Caco2 a été faite sur une durée de 6 heures et sur trois plaques de culture de 96 puits (60 puits utilisés en laissant les bords non utilisés, volume = 200 μL). Ces expériences ont été réalisées par Jonathan Tep à l'École Vétérinaire de Lyon, dans l'équipe de Sylvaine Lecoeur (INRA).

- Plaque 1 (8 conditions, n=6) : étude de la solution brute 1 (ZEN~200 μM). Étant la solution la plus concentrée, en augmentant la concentration en impuretés, on augmente aussi la concentration de ZEN. 5 concentrations sont testées (0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 1 μM) + 2 blé témoin (sans ZEN) + un témoin (milieu de transport) ;
- Plaque 2 (8 conditions, n=6) : étude de la solution brute 15 (ZEN~20 μM). Étant la solution la moins concentrée, en augmentant la concentration en impuretés, on peut travailler à ZEN constante (10 μM) en complétant avec de la ZEN ^{12}C commerciale. 5 concentrations ^{13}C sont testées (0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 1 μM) + du blé témoin (sans ZEN) + du blé témoin avec ZEN ^{12}C 10 μM + un témoin (milieu de transport) ;
- Plaque 3 (6 conditions, n=10) : étude d'une solution de ZEN ^{12}C . 5 concentrations sont testées (0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 1 μM) + un témoin (milieu de transport)

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

De nombreux composés exogènes se trouvent dans notre plus proche environnement, que cela soit dans notre alimentation ou dans l'air que nous respirons. Il s'agit souvent de petites molécules organiques qui peuvent être toxiques au-delà d'un certain seuil et déclencher des réactions immunitaires (allergies) ou des désordres biologiques (mutations génétiques, cancers, troubles hormonaux ou de régulation...). Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux mycotoxines et en particulier à la zéaralénone (ZEN). L'étude de telles molécules ne pose pas de difficultés lorsqu'elles sont isolées, purifiées et en quantités suffisantes pour les seuils de détection des appareils de mesure usuels utilisés en biologie (Chromatographie, RMN, Spectrométrie de masse, etc.). Lorsqu'elles se retrouvent dans un fluide biologique (sang, urines, extraits d'organe...), elles sont souvent en quantités telles que l'effet matrice ou le bruit de fond des appareils rend leur détection et leur dosage très délicats. C'est pourquoi la qualité des purifications et des extractions est, jusqu'à présent, primordiale de manière à s'affranchir de telles difficultés.

Nous voulions développer un système d'analyse adapté à la quantification d'une part de composés parentaux et de leurs métabolites, et d'autre part à la quantification de produits purs mais aussi de produits contenus dans des mélanges complexes inconnus (conditions naturelles d'exposition). Dans ce but, notre travail a porté, tant d'un point de vue expérimental que théorique, sur plusieurs aspects :

- a) L'utilisation de standards internes uniformément enrichis au ^{13}C ou au ^{15}N dont le signal MS est séparé de celui du composé naturel ^{12}C , contrairement à un marquage ciblé au ^2H ou ^{13}C sur une position particulière de la molécule d'intérêt.
- b) L'utilisation de la spectrométrie de masse (et du couplage LC-MS) qui est une technique analytique sensible et adaptée à ce type d'analyse (faibles doses et mélanges).
- c) La préparation de composés uniformément enrichis au ^{13}C dont la signature isotopique est conservée durant le métabolisme et n'est pas affectée par d'éventuels échanges inter ou intra molécules.
- d) L'étude et la quantification du métabolisme et du transport de composés enrichis purs ou en mélanges complexes.
- e) La purification de mycotoxines enrichies et l'étude d'éventuels effets isotopiques liés à l'enrichissement isotopique au ^{13}C .

Le premier objectif de ce travail était donc de mettre au point un outil analytique adapté à la détection et aux études *in vivo* et *in vitro* de composés naturels et de leurs métabolites contenus dans leurs matrices biologiques naturelles. D'un point de vue pharmacologique ou toxicologique, l'étude du métabolisme de ces composés est fondamentale dans la mesure où le produit parental qui entre dans l'organisme (par voie orale, aérienne, cutanée ou autre) est transformé en une série d'autres composés (ses métabolites) qui peuvent avoir des effets bénéfiques (thérapeutiques) ou néfastes (toxiques). Ces derniers sont essentiellement formés au niveau intestinal et/ou hépatique s'il s'agit d'une ingestion orale, et/ou au niveau d'organes cibles si l'exposition est faite par un autre mode (exposition cutanée, intraveineuse, respiratoire, etc.). Il est alors évident que l'étude restreinte au composé parental n'est pas satisfaisante et que les outils que nous souhaitons mettre en œuvre devaient être adaptés non seulement aux composés parentaux mais également à leurs métabolites connus ou inconnus. De plus, **notre intérêt portait sur l'aspect multi-exposition, plus proche des conditions naturelles**. En effet l'exposition d'un organisme à un composé exogène pur est très rare voire inexistante.

L'outil que nous avons choisi et que nous avons utilisé pour les études du métabolisme de la ZEN fut l'enrichissement isotopique uniforme au ^{13}C . Comme cela a été détaillé au chapitre II, nous avons suivi la technique « naturelle » de production et d'enrichissement de la biomasse au ^{13}C (et/ou ^{15}N) (cultures réalisées par Michel Péan au CEA de Cadarache). Cette biomasse a servi de support pour la production des métabolites secondaires enrichis uniformément en ^{13}C (et/ou ^{15}N) (production réalisée par Olivier Puel à l'INRA de Toulouse). L'intérêt de cette technique est qu'elle permet de tracer et de quantifier les différents produits dérivés des composés initialement enrichis : **leurs différents métabolites conservant l'enrichissement initial**. La spectrométrie de masse fut la technique choisie pour les études quantitatives et structurales de la ZEN et des ses métabolites. En effet, l'enrichissement uniforme au ^{13}C permet d'obtenir un massif isotopique sur le spectre de masse du composé qui constitue une véritable signature conservée durant les différentes étapes du métabolisme. Plus précisément, une étude préliminaire sur des composés enrichis uniformément à 10% de ^{13}C a permis de vérifier la faisabilité de notre approche avant de choisir des enrichissements à plus forte teneur en ^{13}C , tout en optimisant le coût et la facilité d'utilisation. Ainsi, nous avons travaillé avec de la ZEN 10%-, 39%- et 81%- ^{13}C et de l'AMP 37%- et 76%- ^{13}C . Les taux élevés d'enrichissement assurant une séparation complète du signal du composé naturel et du signal du composé enrichi.

D'un point de vue quantitatif, nous nous sommes tout d'abord intéressés au taux d'enrichissement optimal en vue d'utiliser une molécule donnée comme standard interne. Pour cela, nous avons élaboré un programme informatique capable de déterminer les intensités du spectre de masse d'un composé donné avec des teneurs données en isotopes stables. **Pour la ZEN, nous avons déterminé que le taux optimal qui permettait d'avoir une contribution inférieure à 0,01% du signal de la masse nominale du composé naturel, était de 46% de ^{13}C .** Au-delà de la prévision d'un spectre de masse, nous avons étudié le problème inverse qui consiste à déterminer, à partir des données spectrales MS, les enrichissements en ^{13}C , ^2H , ^{15}N et ^{18}O d'une molécule. Ces calculs manquent encore de précision (seulement 1%), qui peut s'expliquer en partie par les faibles quantités de produit enrichi contenues dans les matrices naturelles. Ces résultats peuvent être améliorés entre autre, par le croisement des données spectrales MS et MS^n des composés enrichis puisque les fragments formés conservent le même enrichissement que le composé parental.

Nous avons également montré l'intérêt de tels composés uniformément enrichis au ^{13}C en tant que standards internes. En effet, cette approche, moins contraignante que les extractions et purifications multiples, permet de quantifier simplement des échantillons complexes contenant une multitude de composés inconnus. Le principe consiste à ajouter dans l'échantillon à analyser, une quantité connue du standard interne marqué uniformément au carbone 13 (et/ou à l'azote 15). Après d'éventuelles étapes de purification, la mesure de l'intensité (ou du rapport d'intensités) des signaux du composé naturel et du standard interne permet d'accéder aux quantités initialement présentes dans l'échantillon avant purification. Le signal étant plus facilement reconnaissable et identifiable grâce à la présence de l'isotope (pics de masse décalés, massifs isotopiques identifiables en spectrométrie de masse par exemple). Cette approche a été illustrée par des **dosages de ZEN dans des extraits de foie et de plasma de rats traités à la ZEN et des dosages d'AMP dans des plasmas de patients greffés traités au mycophénolate mofétil.**

La multitude des composés formés est un atout car tous les composés d'intérêt sont présents, mais peut aussi être un handicap dans le cadre d'études métaboliques, pour mesurer d'éventuels effets isotopiques dus au ^{13}C . Ces études nécessitent l'utilisation de composés purs (absence de composés interagissant avec la réaction étudiée). Or, dans certains cas, la purification s'est avérée difficile. Ainsi malgré l'utilisation de plusieurs méthodes de purification de la zéaralénone (cartouche de purification, HPLC préparative, colonne d'immuno-affinité) nous avons retrouvé dans plusieurs cas, la **présence de composés co-**

élués capables d'inhiber les réactions enzymatiques étudiées ou de modifier le passage de la ZEN à travers un tapis cellulaire formé de Caco2. De plus, les mycotoxines étudiées étant très hydrophobes, elles possèdent une forte affinité pour le matériel plastique utilisé pour leur extraction et leur analyse. Ainsi alors que les quantités escomptées à partir des dosages effectués sur les extraits bruts étaient de plusieurs dizaines de milligrammes, les rendements finaux ont été, dans le cas de la zéaralénone, de quelques milligrammes. Nous avons pu montrer que des **composés co-élués avec la ZEN agissaient sur l'activité métabolique de la ZEN mais n'empêchaient pas la formation des métabolites.** En effet, la faible quantité formée des métabolites enrichis est due à ces composés et non à l'enrichissement au ^{13}C puisque l'activité de la ZEN ^{12}C est également affectée par leur présence. Un aspect complémentaire de notre étude sur les effets isotopiques expérimentaux concernait l'influence de l'enrichissement isotopique au ^{13}C sur le bilan énergétique de formation de l'OH-ZEN (énergie libre de formation). Pour cela nous avons mené des calculs *ab initio* à l'École Centrale sous la direction de Grégory Geneste. Ces derniers nous ont permis de déterminer **la variation d'énergie libre vibrationnelle associée à la réaction (simplifiée) de formation de l'OH-ZEN à partir de ZEN naturelle, de ZEN enrichie à 50% de ^{13}C et 100% de ^{13}C et ce, dans le vide, dans l'eau et dans l'acétonitrile. Aucune différence notable n'est apparue dans les bilans énergétiques avec les différents enrichissements.** Ces calculs ont été menés en considérant une réaction d'oxydation simple avec du dioxygène, sans tenir compte du catalyseur ni de l'activation de l'oxygène qui intervient lors du cycle catalytique et qui fait toute l'originalité des P450s. Ceci représente une limite dont nous étions conscients : pour aller plus loin, la considération de ce partenaire catalytique pourrait constituer une approche intéressante et plus réaliste. Une étude cinétique serait pertinente pour tenir compte des états de transition intermédiaires faisant intervenir le complexe enzyme-substrat.

Enfin, en raison des problèmes rencontrés lors des extractions de la ZEN et la présence de composés inhibant certaines réactions enzymatiques, nous avons étudié le métabolisme de la ZEN à partir de ZEN commerciale. L'objectif était alors d'identifier un **nouveau métabolite M+16 de la ZEN, retrouvé dans les incubations de ZEN avec des microsomes de rats.** Nous y sommes parvenus en croisant d'une part, les résultats des analyses MS et MSⁿ de plusieurs techniques de spectrométrie de masse (analyses LC-MS haute résolution menées par Erwan Werner au SPI du CEA et analyses GC-MS réalisées par Fabrice Monteau à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes) et d'autre part, l'analyse MSⁿ des analogues de ZEN formant eux aussi un dérivé M+16 dans les mêmes conditions. **Le groupement OH**

additionnel du métabolite OH-ZEN le plus abondant, se forme sur la partie aliphatique de la ZEN, en position α de la cétone. Nous nous sommes par ailleurs intéressés aux propriétés oestrogéniques de ce nouveau métabolite (études réalisées par Patrick Balaguer de l'Inserm Montpellier). Il s'est révélé être moins actif que la ZEN et que l' α -ZAL, tout en présentant **une affinité non nulle vis-à-vis des récepteurs oestrogéniques ER α et ER β ,** contrairement à un autre composé hydroxylé connu de la ZEN et retrouvé directement dans les extraits fongiques. **Les études *in vitro* ont montré que ce métabolite OH-ZEN est formé au niveau hépatique chez plusieurs mammifères, y compris chez l'homme. Plus précisément, sa formation est NADPH-dépendante et les enzymes impliquées dans sa formation sont les CYP 2C8 et 3A4.** Des études *in vivo* chez le rat sont en cours afin de compléter ces premiers résultats (thèse de Radu Duca).

Au cours de toutes ces études, les principaux problèmes rencontrés ont été relatifs à la solubilité et aux effets inhibiteurs de certaines « impuretés » dans les produits « purifiés ». Comme indiqué précédemment, nous avons observé, dans les extraits bruts, des effets inhibiteurs ou cytotoxiques très supérieurs à ceux mesurés sur les produits purifiés ou commerciaux. De ce fait, les essais sur culture de cellules intestinales menés à l'École Nationale Vétérinaire de Lyon sous la direction de Sylvaine Lecoeur, ont été réalisés à des doses faibles et présentant dans certains cas des effets toxiques. Ces faibles quantités avoisinaient alors les seuils de détection des appareils de mesure. Aujourd'hui l'abaissement de ces seuils permettrait l'étude plus aisée du transport de la ZEN ^{13}C à partir d'une solution brute contenant un mélange de composés inconnus.

Concernant les études structurales de l'OH-ZEN, nous avons rencontré des difficultés lors des analyses RMN. Ces difficultés provenaient :

- des faibles doses de métabolite obtenu ;
- de la présence de plusieurs composés hydroxylés ayant des temps de rétention voisins (et donc difficilement séparables) ;
- de la présence de composés co-élués dans les solutions de ZEN ^{13}C inhibant les enzymes responsables de la formation de l'OH-ZEN ^{13}C .

Des purifications plus efficaces sont prévues (notamment par l'utilisation d'une Flash chromatographie) sur une nouvelle production de ZEN enrichie au ^{13}C . La structure de l'OH-ZEN pourra alors être étudiée par RMN : la disparition d'une corrélation ^{13}C - ^1H sur le spectre 2D carbone-proton de l'OH-ZEN par rapport à celui de la ZEN suffirait à confirmer sa position sur le carbone en α de la cétone.

En conclusion, ce travail, qui a été possible grâce à la synergie de l'approche expérimentale menée au CEA de Saclay et de l'approche théorique menée à l'École Centrale, présente plusieurs intérêts sur le plan analytique et toxicologique que nous pouvons résumer en les différents points suivants :

- 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 naturel en spectrométrie de masse ;
- 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-déshydrogénases ;
- Absence d'effet isotopique théorique dans le bilan énergétique de la réaction d'oxydation de la ZEN en OH-ZEN ;
- 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.

Pour finir, signalons que lors de la mise en place de l'étude (2005), le service « valorisation » du CEA Sciences de la vie a été consulté afin de connaître la brevetabilité de l'utilisation de mycotoxines uniformément enrichies à différents taux de ¹³C en tant que standards internes. Du fait du manque d'innovation dans les techniques mises en œuvre, nous n'avons pas déposé de brevet. Toutefois, une équipe Autrichienne a breveté une approche analogue pour préparer des mycotoxines qu'elle a commercialisées courant 2007 (Société Rohmer, Tulin, Autriche et Société Sigma-Aldrich). Cette possibilité de commercialisation a été soumise au service valorisation du CEA Sciences de la vie. A titre de comparaison et pour faire une évaluation du coût, la Société 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 1 mg de zéaralénone/g de blé. Avec le blé produit dans une culture à 100% de ¹³C (coût environ 20 000€ de 100% ¹³CO₂) nous pourrions produire 100 mg de zéaralénone 100% ¹³C. Très récemment une société française a manifesté son intérêt pour notre approche et des négociations sont initiées impliquant les services de valorisation du CEA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abbas, H.K., C. J. Mirocha, T. Kommedahl, R.F. Vesonder, P. Golinski (1989). Production of trichothecene and non-trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species isolated from maize in minnesota. *Mycopathologia* 108(1): 55-8.

Abid-Essefi, S., Z. Ouanes, W. Hassen, I. Baudrimont, E. Creppy, H. Bacha, (2004). Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol In Vitro* 18(4): 467-74.

AFSSA (2006). Rapport synthétique: Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. AFSSA.

Appelgren, L.E., R.G. Arora, P. Larsson (1982). Autoradiographic studies of [³H]zearalenone in mice. *Toxicology* 25(2-3): 243-53.

Artursson, P., J. Karlsson (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175(3): 880-5.

Askonas, L. J., J.W. Ricigliano, T.M. Penning (1991). The kinetic mechanism catalysed by homogeneous rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. Evidence for binary and ternary dead-end complexes containing non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem J* 278 (Pt 3): 835-41.

Avantaggiato, G., R. Havenaar, A. Visconti (2003). Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food Chem Toxicol* 41(10): 1283-90.

B

Balaguer, P., F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A.M. Boussioux, M. Pons, J.C. Nicolas, C. Casellas, (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci Total Environ* 233(1-3): 47-56.

Bellon, S., Y. Gautronneau, G. Riba, I. Savini, B. Sylvander (2000). L'agriculture biologique et l'INRA. Vers un programme de recherche. INRA.

Bennett, J.W., M. Klich (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16(3): 497-516.

Berashevich, J.A., T. Chakraborty (2007). Energy contribution of the solvent to the charge migration in DNA. *The Journal of Chemical Physics* 126(3): 035104.

Bernhoft, A., G.H. Behrens, K. Ingebrigtsen, W. Langseth, S. Berndt, T.B. Haugen, T. Grotmol, (2001). Placental transfer of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rats. *Reprod Toxicol* 15(5): 545-50.

Biehl, M.L., D.B. Prelusky, G.D. Koritz, K.E. Hartin, W.B. Buck, H.L. Trenholm, (1993). Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 121(1): 152-9.

- Boni, R.L., J.T. Simpson, D.B. Naritsin, K. Saito, S.P. Markey (1994). Quantification of l-tryptophan and l-kynurenine by liquid chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 23(1): 27-32.
- Boyacioglu, D., N.S. Hettiarachchy, R.W. Stack (1992). Effect of three systemic fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by fusarium graminearum in wheat. *Can. J. Plant Sci.* 72: 93-101.
- Boyd, P.A., J.L. Wittliff (1978). Mechanism of fusarium mycotoxin action in mammary gland. *J Toxicol Environ Health* 4(1): 1-8.
- Brucato, M., S.F. Sundlof, J.U. Bell, G.T. Edds (1986). Aflatoxin b1 toxicosis in dairy calves pretreated with selenium-vitamin e. *Am J Vet Res* 47(1): 179-83.
- Bullingham, R.E. S., A.J. Nicholls, B.R. Kamm (1998). Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 34(6): 429-55.
- Bullingham, R.E., A. Nicholls, M. Hale (1996). Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (rs61443): A short review. *Transplant Proc* 28(2): 925-9.
- Bullingham, R., S. Monroe, A. Nicholls, M. Hale (1996). Pharmacokinetics and bioavailability of mycophenolate mofetil in healthy subjects after single-dose oral and intravenous administration. *The Journal of Clinical Pharmacology* 36(4): 315.
- Bunger, J., Westphal, G., Monnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., Muller, M. (2004). Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology* 202(3): 199-211.

C

- Celius, T., T.B. Haugen, T. Grotmol, B.T. Walther (1999). A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. *Environ Health Perspect* 107(1): 63-8.
- Charmley, L.L, D.B. Preluksy (1994). Compounds other than aflatoxin. *Mycotoxin in grain*, Eagan Press, St Paul(421-435).
- Charmley, L.L, H.L.Trenholm (2000). A review of current literature on mycotoxins and their regulations. unpublished review for canadian food inspection agency.
- Charmley, L.L., D.B. Preluksy, H.L.Trenholm (1995). Mycotoxins: Their origin, impact and importance: Insights into common methods of control and elimination. *Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings ag alltech's eleventh annual symposium*: 41-63.
- Christensen, C.M., C.J. Mirocha, R.A. Meronuck (1977). Molds mycotoxins and mycotoxicoses. *Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report* 142.

Coffey, M.T., W.M. Hagler, J.M. Cullen (1989). Influence of dietary protein, fat or amino acids on the response of weanling swine to aflatoxin b1. *Journal of Animal Science* 67(2): 465.

Cole, R.J., M.A. Schweikert, B.B. Jarvis (2003). *Handbook of secondary fungal metabolites*. Academic Press (London).

Coulombe, R.A. (1993). Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 76(3): 880.

D

Dalcero, A., A. Torres, M. Etcheverry, S. Chulze, E. Varsavsky (1997). Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in argentinian wheat. *Food Addit Contam* 14(1): 11-4.

de Montellano, P.R.O. (1986). P-450, structure, mechanism, and biochemistry.

Deferme, S., P. Annaert, P. Augustijns (2008). In vitro screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. *Drug absorption studies*: 182.

di Menna, M.E., D.R. Lauren, A. Hardacre (1997). Fusaria and *Fusarium* toxins in new zealand maize plants. *Mycopathologia* 139(3): 165.

Diaz, D.E., W.M. Hagler, B.A. Hopkins, J.A. Eve, L.W. Whitlow (1999). The potential for dietary sequestering agents to reduce the transmission of dietary aflatoxin to milk of dairy cows and to bind aflatoxin in vitro. *J. Dairy Sci.* 82: 838.

Diekman, M.A., M.L. Green (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci* 70(5): 1615-27.

Doko, M.B., C. Canet, N. Brown, E.W. Sydenham, S. Mpuchane, B.A. Siame (1996). Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from eastern and southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(10): 3240.

Draper, A.J., A. Madan, A. Parkinson (1997). Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341(1): 47.

E

El-Sharkawy, S., Y.J. Abul-Hajj (1988). Microbial transformation of zearalenone. 2 reduction, hydroxylation, and methylation products. *J. Org. Chem.* 53(3): 515-519.

Eriksen, G.S., J. Alexander (1998). *Fusarium* toxins in cereals: A risk assessment. Nordic Council of Ministers; TemaNord 1998: 502: pp. 7-27 and 45-58; Copenhagen.

Escande, A., A. Pillon, N. Servant, J.P. Cravedi, F. Larrea, P. Muhn, J.C. Nicolas, V. Cavailles, P. Balaguer (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochemical Pharmacology* 71(10): 1459.

F

Fogh, J., J.M. Fogh, T. Orfeo (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59(1): 221-6.

Fulton, B., A. Markham (1996). Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 51(2): 278-98.

G

Galvano, F., A. Piva, A. Ritieni, G. Galvano (2001). Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection* 64: 120.

Gareis, M., J. Ceynowa (1994). Effect of the fungicide matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *Z Lebensm Unters Forsch* 198(3): 244-8.

Garfinkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 77(2): 493-509.

Gaumy, J.L., J.D. Bailly, V. Burgat, P. Guerre (2001). Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. *Revue Médicale Vétérinaire* 152(3): 219-234.

Guengerich, F.P. (1994). Analysis and characterization of enzymes. Principles and Methods of Toxicology, New York, NY: Raven Press: pp. 1259-1313.

H

Hagler, W.M., G. Danko, L. Horvath, M. Palyusik, C.J. Mirocha (1980). Transmission of zearalenone and its metabolite into ruminant milk. *Acta Vet Acad Sci Hung* 28(2): 209-16.

Hagler, W.M., K. Tyczkowska, P.B. Hamilton (1984). Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone, and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the midwestern united states. *Applied and Environmental Microbiology* 47(1): 151.

Hamilton, P.B. (1984). Determining safe levels of mycotoxins. *J. Food Prot.* 47: 570-575.

Hesseltine, C.W. (1986). Resumé and future needs in the diagnosis of mycotoxins. J.L. Richard and J.R. Thurston, (Eds.). *Diagnosis of Mycotoxicoses*: pp. 381-385.

Hevesy, G., F. Paneth (1913). Die löslichkeit des bleisulfids und bleichromats. *Zeitschrift für anorganische Chemie* 82(1): 323-328.

Hohenberg, P., W. Kohn (1964). Inhomogeneous electron gas. *Phys Rev.* 136(3): 864-871.

I

Ikryannikova, L.N., L.Y. Ustynyuk, A.N. Tikhonov (2004). Dft study of nitroxide radicals. 1. Effects of solvent on structural and electronic characteristics of 4-amino-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-n-oxyl. *J. Phys. Chem.* (108): 4759-4768

INRA (2004). Mycotoxines, minéraux et éléments traces. Étude de l'alimentation totale française.

J

JECFA (2000). Joint fao/who expert committee on food additives.

Joffe, A.Z. (1986). *Fusarium* species: Their biology and toxicology. John Wiley and Sons, Inc., New York

K

Kao, C., R.J. Robinson (1972). *Aspergillus flavus* deterioration of grain: Its effect on amino acids and vitamins in whole wheat. *Journal of Food Science* 37(2): 261-263.

Katzenellenbogen, B.S., J.A. Katzenellenbogen, D. Mordecai (1979). Zearalenones: Characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal beta-resorcylic acid lactones. *Endocrinology* 105(1): 33-40.

Khoufache, K., O. Puel, N. Loiseau, M. Delaforge, D. Rivollet, A. Coste, C. Cordonnier, E. Escudier, F. Botterel, S. Bretagne (2007). Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiol* 7: 5.

Kiang, D.T., B.J. Kennedy, S.V. Pathre, C.J. Mirocha (1978). Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. *Cancer Res* 38(11 Pt 1): 3611-5.

Kiessling, K. H., H. Pettersson (1978). Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 43(4): 285-90.

Kiessling, K.H., H. Pettersson, K. Sandholm, M. Olsen (1984). Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 47(5): 1070.

Kleinova, M., P. Zollner, H. Kahlbacher, W. Hochsteiner, W. Lindner (2002). Metabolic profiles of the mycotoxin zearalenone and of the growth promoter zeranol in urine, liver, and muscle of heifers. *J Agric Food Chem* 50(17): 4769-76.

Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75(2): 376-86.

Kohn, W., L.J. Sham (1965). Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.* 140(A1133).

Kouadio, J.H., T.A. Mobio, I. Baudrimont, S. Moukha, S.D. Dano, E.E. Creppy (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin b1 in human intestinal cell line caco-2. *Toxicology* 213(1-2): 56-65.

Kuiper, G.G., J.G. Lemmen, B. Carlsson, J.C. Corton, S.H. Safe, P.T. van der Saag, B. van der Burg, J.A. Gustafsson (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139(10): 4252-63.

Kuiper-Goodman, T., P.M. Scott, H. Watanabe (1987). Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 7(3): 253-306.

Kuo, C.H., D. Taub, R.D. Hoffsommer, N.L. Wendler (1967). The resolution of \pm -zearalenone. Determination of the absolute configuration of the natural enantiomorph. *Chem. Commun.*: 761-762.

L

Lacey, J. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. « *Mycotoxins and Animal Foods* ». CRC Press, Boca Raton.: pp. 363-397.

Lee, A.J., M.X. Cai, P.E. Thomas, A.H. Conney, B.T. Zhu (2003). Characterization of the oxidative metabolites of 17β -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 144(8): 3382.

Li, J.J., S.A. Li, J.K. Klicka, J.A. Heller (1985). Some biological and toxicological studies of various estrogen mycotoxins and phytoestrogens. In MacLachlan JA (ed.), *Estrogens in The Environment. II Influences on developpement*: pp. 168-186.

Lioi, M.B., A. Santoro, R. Barbieri, S. Salzano, M.V. Ursini (2004). Ochratoxin A and zearalenone: A comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557(1): 19.

Liu, M.T., B.P. Ram, L.P. Hart, J.J. Pestka (1985). Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol* 50(2): 332-6.

M

Malekinejad, H., B. Colenbrander, J. Fink-Gremmels (2006). Hydroxysteroid dehydrogenases in bovine and porcine granulosa cells convert zearalenone into its hydroxylated metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol. *Vet Res Commun* 30(4): 445-53.

Malekinejad, H., H.T. Van Tol, B. Colenbrander, J. Fink-Gremmels (2006). Expression of 3alpha- and 3beta-hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in coes and granulosa cells determines zearalenone biotransformation. *Toxicol In Vitro* 20(4): 458-63.

Malekinejad, H., R.F. Maas-Bakker, J. Fink-Gremmels (2005). Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Vet Res* 36(5-6): 799-810.

Malekinejad, H., R.F. Maas-Bakker, J. Fink-Gremmels (2005). Enzyme kinetics of zearalenone biotransformation: Ph and cofactor effects. *Arch Toxicol* 79(10): 547-553.

Malekinejad, H., R. Maas-Bakker, J. Fink-Gremmels (2006). Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J* 172(1): 96-102.

Mansuy, D., P. Battioni (1999). Diversity of reactions catalyzed by heme-thiolate proteins. *The Porphyrin Handbook*: pp. 1±15.

Merk-Index (1996). Twelfth Edition: 1730-1731.

Michelot, D., R. Labia (1988). Alpha-amanitin: A possible suicide substrate-like toxin involving the sulphoxide moiety of the bridged cyclopeptide. *Drug Metabol Drug Interact* 6(3-4): 265-74.

Mirocha, C.J., S.V. Pathre, T.S. Robison (1981). Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol* 19(1): 25-30.

Molto, G.A., H.H. Gonzalez, S.L. Resnik, A. Pereyra Gonzalez (1997). Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium spp.* From argentinian maize. *Food Addit Contam* 14(3): 263-8.

Morissette, P., C. Albert, S. Busque, G. St-Louis, B. Vinet (2001). In vivo higher glucuronidation of mycophenolic acid in male than in female recipients of a cadaveric kidney allograft and under immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil. *Ther Drug Monit* 23(5): 520-5.

N

Nelson, P.E., A.E. Desjardins, R.D. Plattner (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology* 31(1): 233.

Nguyen, T.A. (2007). Relations structure-fonction dans la superfamille des cytochromes p450. Études bioinformatiques. Thèse.

Nielsen, K.F., J. Smedsgaard (2003). Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A* 1002(1-2): 111.

Nowak, I., L.M. Shaw (1995). Mycophenolic acid binding to human serum albumin: Characterization and relation to pharmacodynamics. *Clinical Chemistry* 41(7): 1011.

O

O'Leary, M.H. (1980). Determination of heavy-atom isotope effects on enzyme-catalyzed reactions. *Methods in Enzymology* 64: pp 83-104.

Omura, T., R. Sato (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237: 1375-6.

Ordejón, P., E. Artacho, J.M. Soler (1996). Self-consistent order-n density-functional calculations for very large systems. *Physical Review B* 53(16): R10441.

P

- Palyusik, M., B. Harrach, C.J. Mirocha, S.V. Pathre (1980). Transmission of zearalenone and zearalenol into porcine milk. *Acta Vet Acad Sci Hung* 28(2): 217-22.
- Panneerselvam, K., E. Rudino-Pinera, M. Soriano-Garcia (1996). Zearalenone. *Acta Cryst* 52: 3095-3097.
- Penning, T.M. (2003). Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum Reprod Update* 9(3): 193-205.
- Penning, T.M., J.E. Pawlowski, B.P. Schlegel, J.M. Jez, H.K. Lin, S.S. Hoog, M.J. Bennett, M. Lewis (1996). Mammalian 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* 61(9): 508-23.
- Penning, T.M., M.J. Bennett, S. Smith-Hoog, B.P. Schlegel, J.M. Jez, M. Lewis (1997). Structure and function of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 62(1): 101-11.
- Perdew, J.P., K. Burke, M. Ernzerhof (1996). Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters* 77(18): 3865.
- Persson, B., Y. Kallberg, U. Oppermann, H. Jornvall (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (sdrs). *Chem Biol Interact* 143-144: 271-8.
- Pfeiffer, E., A. Heyting, M. Metzler (2007). Novel oxidative metabolites of the mycoestrogen zearalenone in vitro. *Mol Nutr Food Res* 51(7): 867-71.
- Pfohl-Leszkowicz, A., L. Chekir-Ghedira, H. Bacha (1995). Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis* 16(10): 2315.
- Picard, N., T. Cresteil, A. Premaud, P. Marquet (2004). Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Ther Drug Monit* 26(6): 600-8.
- Pinto, M., S. Robineleon, M.D. Appay, M. Kedingler, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simonassmann, K. Haffen, J. Fogh, A. Zweibaum (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line caco-2 in culture. *Biology Of The Cell* 47(3): 323-330.
- Pirog, E.C., D.C. Collins (1994). 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat liver and skin. *Steroids* 59(4): 259-64.
- Placinta, C.M., J.P.F. D'Mello, A.M.C. Macdonald (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78(1-2): 21-37.
- Prelusky, D.B., P.M. Scott, H.L. Trenholm, G.A. Lawrence (1990). Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J Environ Sci Health B* 25(1): 87-103.
- Price, K.R. (1979). A comparison of two quantitative mass spectrometric methods for the analysis of patulin in apple juice. *Biological Mass Spectrometry* 6(12): 573-574.

Puel, O., S. Tadrict, P. Galtier, I.P. Oswald, M. Delaforge (2005). *Byssoschlamys nivea* as a source of mycophenolic acid. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 550-553.

R

Ramosa, A.J., E.J. Hernándezb, M. Plá-Delfinac, M. Merinoc (1996). Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. *International Journal of Pharmaceutics* 128(1-2): 129-137.

Rendic, S. (2002). Summary of information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* 34(1): 83.

Riley, R.T. (1998). Mechanistic interaction of mycotoxins: Theoretical considerations. Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*: pp 227-253.

Ritter, J.K. (2000). Roles of glucuronidation and udp-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 129(1-2): 171-93.

S

Sai, Y., A. Tsuji (2004). Transporter-mediated drug delivery: Recent progress and experimental approaches. *Drug Discovery Today* 9(16): 712.

Schaeffer, J.L., P.B. Hamilton (1991). Interactions of mycotoxins with feed ingredients. Do safe levels exist? J. E. Smith and R. S. Henderson (Eds.) « *Mycotoxins and Animal Foods* »: pp 827-843.

Schiefer, H.B. (1990). Mycotoxicoses of domestic animals and their diagnosis. *Can J Physiol Pharmacol* 68(7): 987-90.

Schutz, E., M. Shipkova, V.W. Armstrong, E. Wieland, M. Oellerich (1999). Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 45(3): 419-22.

Shah, P., V. Jogani, T. Bagchi, A. Misra (2006). Role of caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog* 22(1): 186-98.

Sharma, R.P. (1993). Immunotoxicity of mycotoxins. *Journal of Dairy Science* 76(3): 892.

Shaw, L.M., H.W. Sollinger, P. Halloran, R.E. Morris, R.W. Yatscoff, J. Ransom, I. Tsina, P. Keown, D.W. Holt, R. Lieberman (1995). Mycophenolate mofetil: A report of the consensus panel. *Ther Drug Monit* 17(6): 690-9.

Shier, W.T., A.C. Shier, W. Xie, C.J. Mirocha (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* 39(9): 1435-8.

Shimada, T., M. Mimura, K. Inoue, S. Nakamura, H. Oda, S. Ohmori, H. Yamazaki (1997). Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal

species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Archives of Toxicology* 71(6): 401.

Shipkova, M., V.W. Armstrong, D. Kuypers, F. Perner, V. Fabrizi, H. Holzer, E. Wieland, M. Oellerich (2001). Effect of cyclosporine withdrawal on mycophenolic acid pharmacokinetics in kidney transplant recipients with deteriorating renal function: Preliminary report. *Ther Drug Monit* 23(6): 717-21.

Shipkova, M., V.W. Armstrong, E. Wieland, P.D. Niedmann, E. Schutz, G. Brenner-Weisz, M. Voihsel, F. Braun, M. Oellerich (1999). Identification of glucoside and carboxyl-linked glucuronide conjugates of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. *Br J Pharmacol* 126(5): 1075-82.

Shipkova, M., V.W. Armstrong, L. Weber, P.D. Niedmann, E. Wieland, J. Haley, B. Tonshoff, M. Oellerich (2002). Pharmacokinetics and protein adduct formation of the pharmacologically active acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in pediatric renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 24(3): 390-9.

Shipkova, M., V.W. Armstrong, M. Oellerich, E. Wieland (2003). Acyl glucuronide drug metabolites: Toxicological and analytical implications. *Ther Drug Monit* 25(1): 1-16.

Shreeve, B.J., D.S. Patterson, B.A. Roberts (1979). The 'carry-over' of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. *Food Cosmet Toxicol* 17(2): 151-2.

Smith, D.A., H. van de Waterbeemd, D.K. Walker (2001). Pharmacokinetics and metabolism in drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry* 36(11-12): 968.

Smith, J.W., C.H. Hill, P.B. Hamilton (1971). The effect of dietary modifications on aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poult Sci* 50(3): 768-74.

Soddy, F. (1913). Intra-atomic charge. *Nature* 92: p 399-400.

Soler, J.M., E. Artacho, J.D. Gale, A. Garcia, J. Junquera, P. Ordejón, D. Sánchez-Portal (2002). The siesta method for ab initio order-n materials simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter* 14(11): 2745.

Songsermsakul, P., G. Sontag, M. Cichna-Markl, J. Zentek, E. Razzazi-Fazeli (2006). Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-APCI-MS. *Journal of Chromatography B* 843(2): 252.

Sorensen, L.K., T.H. Elbaek (2005). Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 820(2): 183-96.

T

Takemura, H., J.Y. Shim, K. Sayama, A. Tsubura, B.T. Zhu, K. Shimoï (2007). Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol *in vivo* and *in vitro*. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 103(2): 170.

Takikawa, H., A. Stolz, N. Kaplowitz (1987). Cyclical oxidation-reduction of the c3 position on bile acids catalyzed by rat hepatic 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. I. Studies with the purified enzyme, isolated rat hepatocytes, and inhibition by indomethacin. *J Clin Invest* 80(3): 852-60.

Trenholm (1982). Vomitoxine et zéaralénone dans les aliments du bétail. *Agriculture Canada* 1745F.

Trenholm (1988). Réduction des mycotoxines dans les aliments destinés aux animaux. *Agriculture Canada* 1827F.

Troullier, N., J.L. Martins (1991). Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. *Physical Review B* 43(3): 1993.

Tsubota, T., H. Nitta, Y. Osawa, J.I. Mason, I. Kita, T. Tiba, J.M. Bahr (1993). Immunolocalization of steroidogenic enzymes, P450scc, 3[beta]-HSD, P450C17, and P450arom in the hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) testis. *Gen Comp Endocrinol* 92(3): 439.

U

Ueno, Y., F. Tashiro (1981). Alpha-zearalenol, a major hepatic metabolite in rats of zearalenone, an estrogenic mycotoxin of *Fusarium* species. *J Biochem (Tokyo)* 89(2): 563-71.

Ueno, Y., U.S. Lee, T. Tanaka, A. Hasegawa, Y. Matsuki (1986). Examination of Chinese and U.S.S.R. Cereals for the *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicon* 24(6): 618-21.

Underhill (1996). Fiche technique-. Les mycotoxines. Programme d'inspection sur les mycotoxines.

V

Vesonder, R.F., P. Goliński, R. Plattner, D.L. Zietkiewicz (1991). Mycotoxin formation by different geographic isolates of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia* 113(1): 11.

W

Whitlow, L.W. (2001). La contamination des aliments par les mycotoxines: Un facteur de stress additionnel pour les bovins laitiers. Le Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ).

Wieland, E., M. Shipkova, U. Schellhaas, E. Schutz, P.D. Niedmann, V. W. Armstrong, M. Oellerich (2000). Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: A link to side effects? *Clin Biochem* 33(2): 107-13.

Wrighton, S.A., J.C. Stevens (1992). The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Critical Reviews in Toxicology* 22(1): 1.

Y

Yamashita, A., T. Yoshizawa, Y. Aiura, P.C. Sanchez, E.I. Dizon, R.H. Arim (1995). *Fusarium* mycotoxins (fumonisins, nivalenol, and zearalenone) and aflatoxins in corn from southeast asia. *Biosci Biotechnol Biochem* 59(9): 1804-7.

Z

Zinedine, A., J.M. Soriano, J.C. Molto, J. Manes (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 45(1): 1-18.

Zollner, P., J. Jodlbauer, M. Kleinova, H. Kahlbacher, T. Kuhn, W. Hochsteiner, W. Lindner (2002). Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *J Agric Food Chem* 50(9): 2494-501.

(1996-1997). Plant products division. National feed inspection programs 1(3): 93.

(2000). Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins, part 2: Zearalenone (zea).

ANNEXE I

CALCULS THÉORIQUES *AB INITIO*

Contexte théorique :

La théorie de la fonctionnelle de la densité (Density functional theory, ou DFT en anglais) est une méthode de mécanique quantique utilisée en physique et en chimie pour déterminer la structure électronique d'un système à plusieurs corps tel qu'une molécule. La DFT est parmi les méthodes les plus répandues et qui évoluent vite, disponibles en physique du solide, en physique et en chimie théorique.

Modèle de Thomas-Fermi

Le modèle de Thomas Fermi précédait celui de la théorie fonctionnelle de densité et a été développé en 1927 par Thomas et Fermi. Ils utilisaient un modèle statistique pour approximer la distribution électronique d'un atome. Ils partent du postulat que les électrons sont distribués uniformément avec deux électrons par unité de volume h^3 . Pour chaque élément de volume d^3r on peut remplir une sphère de quantité de mouvement allant jusqu'à celle de fermi p_f .

$$(4/3)\pi p_f^3(r) \quad \text{et} \quad n(r) = \frac{8\pi}{3h^3} p_f^3(r)$$

En substituant p_f dans la formule classique d'énergie cinétique on obtient alors directement une énergie cinétique représentée en tant que fonctionnelle de la densité d'électron.

$$T_{TF}[n] = C_F \int n^{5/3}(r) d^3r.$$

Bien que cette première étape ait été importante, l'exactitude de l'équation de Thomas-Fermi est limitée parce que la fonctionnelle d'énergie cinétique résultante est seulement approximative. En outre, cette méthode n'essaye pas de représenter l'énergie d'échange d'un atome en tenant compte du principe de Pauli. C'est pourquoi une énergie d'échange fonctionnelle a été ajoutée par Dirac en 1928.

Principe et description de la théorie de la DFT

Les théories traditionnelles de calculs de structure électronique, en particulier la théorie d'Hartree-Fock et les suivantes, sont basées sur une fonction d'onde complexe à plusieurs électrons. Cette dernière est une méthode de résolution approchée de l'équation de

Schrödinger d'un système quantique à N électrons dans laquelle la fonction d'onde approchée est écrite sous la forme d'un déterminant de Slater :

$$\Psi^{HF} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\xi_1) & \phi_2(\xi_1) & \dots & \phi_N(\xi_1) \\ \phi_1(\xi_2) & \phi_2(\xi_2) & \dots & \phi_N(\xi_2) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \phi_1(\xi_N) & \phi_2(\xi_N) & \dots & \phi_N(\xi_N) \end{vmatrix}$$

Les orbitales de spin $\phi_i(\xi_j)$ sont les solutions d'un système d'équations différentielles couplées appelées équation Hartree-Fock:

$$\hat{F}\phi_i(\xi_i) = \epsilon_i\phi_i(\xi_i)$$

où \hat{F} est l'opérateur de Fock. Dans le cas des atomes et des molécules l'opérateur de Fock a pour expression:

$$\hat{F} = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla_{\mathbf{r}_i}^2 + \hat{V}_{eN}(\mathbf{r}_i) + \sum_j \hat{J}_j - \hat{K}_j$$

L'opérateur $-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla_{\mathbf{r}_i}^2$ correspond à l'énergie cinétique de l'électron i , l'opérateur $\hat{V}_{eN}(\mathbf{r}_i)$ au potentiel électrostatique entre cet électron et le(s) noyau(x), l'opérateur \hat{J}_j ou opérateur coulombien représente le potentiel moyen créé par les autres électrons et \hat{K}_j , l'opérateur d'échange- correction dû à l'antisymétrie.

$$\hat{J}_j = \int \phi_j^*(\xi_2) \frac{1}{|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|} \phi_j(\xi_2) d\xi_2$$

$$\hat{K}_j\phi_i(\xi_1) = \int \phi_j^*(\xi_2) \frac{1}{|\mathbf{r}_2 - \mathbf{r}_1|} \phi_i(\xi_2) \phi_j(\xi_1) d\xi_2$$

Cette méthode est une approximation de champ moyen à particules indépendantes. L'opérateur de Fock dépendant explicitement de ses solutions, la méthode de résolution la plus utilisée est la méthode du champ autocohérent. Il s'agit d'une méthode itérative où

l'opérateur de Fock est mis à jour à chaque itération avec les orbitales de spin calculées à l'itération précédente. Le calcul est arrêté lorsqu'une convergence satisfaisante (sur l'énergie, la fonction d'onde, .. etc.) est obtenue.

L'objectif principal de la théorie fonctionnelle de densité est de remplacer la fonction d'onde électronique à plusieurs corps par la densité électronique comme quantité de base. Considérant que la fonction d'onde à plusieurs corps dépend de $3N$ variables, trois variables spatiales pour chacun des N électrons, la densité est seulement une fonction de trois variables et est une quantité plus simple à traiter conceptuellement et pratiquement. Le développement de nouvelles méthodes de DFT a été conçu pour surmonter ce problème.

La mise en œuvre la plus commune de la théorie fonctionnelle de densité utilise la méthode de Kohn-Sham. Dans le cadre de la Kohn-Sham DFT, le délicat problème à plusieurs corps prenant en compte l'interaction des électrons entre eux dans un potentiel externe statique est réduit à un problème soluble d'électrons n'interagissant pas l'un sur l'autre dans un potentiel effectif. Le potentiel effectif inclut le potentiel externe et les effets des interactions de coulomb entre les électrons, par exemple les interactions d'échange et de corrélation. Toute la difficulté de la KS DFT réside alors dans la modélisation de ces deux dernières interactions. L'approximation la plus simple est l'approximation de local-densité (LDA), qui est basée sur l'énergie exacte d'échange corrélation pour un gaz uniforme d'électrons et qui peut être obtenue à partir de calculs plus sophistiqués et très lourds à mettre en œuvre (Monte Carlo Quantique) et des ajustements de l'énergie de corrélation pour un gaz uniforme d'électrons.

La DFT a été très populaire pour des calculs de physique du solide depuis les années 70. Dans beaucoup de cas la DFT, avec l'approximation de local-densité, donne des résultats tout à fait satisfaisants pour des calculs de semi-conducteurs par exemple, par rapport aux données expérimentales. Les coûts informatiques sont relativement bas comparés à d'autres manières de résoudre un problème de mécanique quantique à plusieurs corps. Cependant, elle n'a pas été considérée assez précise pour des calculs de chimie quantique jusqu'aux années 90, jusqu'à ce que les approximations utilisées dans la théorie aient été considérablement affinées pour améliorer le modèle des interactions d'échange et de corrélation. La DFT est maintenant l'une des principales méthodes pour des calculs de structure électronique dans les deux domaines. En dépit des améliorations de la DFT, il y a toujours des difficultés pour décrire

correctement des interactions intermoléculaires, particulièrement les forces de van der Waals (dispersion), ou pour calculer des bandes énergétiques pour les semi-conducteurs. Ses limites quant aux calculs de dispersion rendent la DFT inadaptée (du moins utilisée seul) pour le traitement des systèmes qui sont dominés par la dispersion (par exemple des atomes de gaz noble interagissant entre eux) ou pour des systèmes où la dispersion concurrence de manière significative d'autres effets (par exemple dans les biomolécules). De nouvelles méthodes de DFT ont été développées pour surmonter ce problème. En particulier le changement de fonctionnelle ou l'ajout de termes additifs, font l'objet de recherches actuelles.

Formalisme

Dans des calculs de structures électroniques à plusieurs corps, les noyaux des molécules traitées sont usuellement considérés comme fixes (approximation dite de Born-Oppenheimer), produisant ainsi un potentiel externe statique V dans lequel les électrons se déplacent. Un état électronique stationnaire est alors décrit par une fonction d'onde $\Psi(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N)$ vérifiant l'équation de Schrödinger à plusieurs électrons :

$$H\Psi = [T + V + U] \Psi = \left[\sum_i^N -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla_i^2 + \sum_i^N V(\vec{r}_i) + \sum_{i<j} U(\vec{r}_i, \vec{r}_j) \right] \Psi = E\Psi$$

où H est le hamiltonien moléculaire électronique, N le nombre d'électrons et U l'interaction électrostatique électron-électron. Les opérateurs T et U sont de prétendus opérateurs universels car ils sont identiques pour n'importe quel système, alors que V dépend du système. Comme on peut le voir, la différence entre un problème de simple particule et le problème beaucoup plus compliqué de plusieurs particules réside juste dans le terme d'interaction U . Il y a beaucoup de méthodes sophistiquées pour résoudre l'équation de Schrödinger à plusieurs corps basées sur l'approximation de la fonction d'onde grâce au déterminant de Slater. Alors que la méthode la plus simple est celle de Hartree-Fock, des approches plus complexes sont habituellement classées par catégorie en tant que méthodes post Hartree-Fock. Cependant, l'inconvénient majeur de ces méthodes est l'important coût informatique qui rend pratiquement impossible leur application efficace pour des systèmes complexes.

Ici la DFT fournit une alternative intéressante, puisqu'elle est beaucoup plus souple et permet de ramener systématiquement un problème à plusieurs corps avec U , à un problème à un seul

corps sans U. Dans la DFT la variable principale est la densité de particules $n(\vec{r})$ qui est donnée par

$$n(\vec{r}) = N \int d^3r_2 \int d^3r_3 \cdots \int d^3r_N \Psi^*(\vec{r}, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \Psi(\vec{r}, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N).$$

Hohenberg et Kohn ont prouvé en 1964 que la relation exprimée ci-dessus peut être renversée, *i.e.* qu'à une densité donnée d'état fondamental il est en principe possible de calculer la fonction d'onde correspondante $\Psi_0(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N)$. En d'autres termes, Ψ_0 est une fonctionnelle unique de n_0 , *i.e.*

$$\Psi_0 = \Psi_0[n_0]$$

Par conséquent toutes les autres observables O de l'état fondamental sont également des fonctionnelles de n_0

$$\langle O \rangle [n_0] = \langle \Psi_0[n_0] | O | \Psi_0[n_0] \rangle .$$

On peut donc en déduire, en particulier, que l'énergie de l'état fondamental est une également une fonctionnelle de n_0 :

$$E_0 = E[n_0] = \langle \Psi_0[n_0] | T + V + U | \Psi_0[n_0] \rangle,$$

La contribution du potentiel externe $\langle \Psi_0[n_0] | V | \Psi_0[n_0] \rangle$ peut être explicitement écrite en termes de densité :

$$V[n] = \int V(\vec{r}) n(\vec{r}) d^3r.$$

Les fonctionnelles $T[n]$ et $U[n]$ sont dites universelles tandis que $V[n]$ n'est évidemment pas universelle, car elle dépend du système d'étude. Après avoir indiqué un système, *i.e.* V est connu, la fonctionnelle doit alors être minimisée :

$$E[n] = T[n] + U[n] + \int V(\vec{r}) n(\vec{r}) d^3r$$

Pour le calcul de $n(\vec{r})$ on fixe dans un premier temps les expressions de $T[n]$ et $U[n]$. Une minimisation correcte de la fonctionnelle de l'énergie permettra d'accéder à la densité de l'état fondamental n_0 et ainsi à toutes les autres observables de l'état fondamental.

Le problème variationnel de la minimisation de la fonctionnelle de l'énergie $E[n]$ peut être résolu en appliquant la méthode lagrangienne de multiplicateurs indéterminés, qui a été utilisée par Kohn et Sham en 1965. Pour cela, on utilise le fait que la fonctionnelle dans l'équation ci-dessus peut être écrite comme une fonctionnelle factice de densité d'un système sans interactions :

$$E_s[n] = \langle \Psi_s[n] | T_s + V_s | \Psi_s[n] \rangle ,$$

où T_s est un terme d'énergie cinétique sans interactions et V_s un potentiel effectif externe dans lequel les particules se déplacent. Évidemment $n_s(\vec{r}) \stackrel{\text{def}}{=} n(\vec{r})$, si V_s est choisi tel que

$$V_s = V + U + (T - T_s) .$$

Ainsi, on peut résoudre les équations de Kohn-Sham de ce système sans interactions.

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V_s(\vec{r}) \right] \phi_i(\vec{r}) = \epsilon_i \phi_i(\vec{r}) ,$$

Ceci permet d'accéder aux orbitales ϕ_i puis à la densité $n(\vec{r})$ du système originel à plusieurs corps :

$$n(\vec{r}) \stackrel{\text{def}}{=} n_s(\vec{r}) = \sum_i^N |\phi_i(\vec{r})|^2 .$$

Le potentiel effectif V_s d'une particule isolée peut être écrit plus précisément :

$$V_s = V + \int \frac{e^2 n_s(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d^3 r' + V_{\text{XC}}[n_s(\vec{r})] ,$$

où le deuxième terme est le terme de Hartree décrivant la répulsion coulombienne électron-électron, alors que le dernier terme V_{XC} est le potentiel d'échange corrélation. Ici, V_{XC} inclut

toutes les interactions entre particules. Puisque le terme de Hartree et V_{XC} dépendent de $n(\vec{r})$, qui dépend de ϕ_i , lequel dépend à son tour de V_s , la résolution de l'équation de Kohn-Sham se ramène à la résolution d'un système autocohérent, *i.e.* itératif. Habituellement on commence par une première conjecture pour $n(\vec{r})$, puis on calcule le V_s correspondant et on résout les équations de Kohn-Sham pour ϕ_i . À partir de là, on calcule une nouvelle densité et on recommence. Ce procédé est alors répété jusqu'à ce que l'on atteigne la convergence.

Approximations

Le problème principal avec la DFT est que les fonctionnelles d'échange et de corrélation ne peuvent pas être connues avec précision excepté pour le gaz d'électrons libres. Cependant, des approximations existent qui permettent le calcul précis de certaines quantités physiques. L'approximation la plus couramment employée est l'approximation de densité locale (LDA), où la fonctionnelle dépend seulement de la densité au point où la fonctionnelle est évaluée :

$$E_{XC}[n] = \int \epsilon_{XC}(n)n(r)d^3r.$$

L'approximation locale de densité de spin (LSDA) est une large généralisation de la LDA pour inclure le spin de l'électron :

$$E_{XC}[n_{\uparrow}, n_{\downarrow}] = \int \epsilon_{XC}(n_{\uparrow}, n_{\downarrow})n(r)d^3r.$$

Des formules très précises pour la densité d'énergie d'échange-corrélation $\epsilon_{XC}(n_{\uparrow}, n_{\downarrow})$ ont été construites à partir de simulations de Monte Carlo Quantique sur un gaz d'électrons homogène.

Les approximations de gradient généralisé (GGA) sont toujours des approximations locales mais tiennent compte également du gradient de la densité au point considéré :

$$E_{XC}[n_{\uparrow}, n_{\downarrow}] = \int \epsilon_{XC}(n_{\uparrow}, n_{\downarrow}, \vec{\nabla}n_{\uparrow}, \vec{\nabla}n_{\downarrow})n(r)d^3r.$$

En utilisant ces dernières approximations (GGA) de très bons résultats ont été obtenus pour des calculs de géométries moléculaires et pour les calculs des énergies de l'état fondamental.

Beaucoup d'autres améliorations ont été apportées à la DFT en développant de meilleures représentations des fonctionnelles.

Applications

En pratique, la théorie de Kohn-Sham peut être appliquée de plusieurs manières selon ce qui est étudié. Pour des calculs de semi-conducteurs, les approximations locales de densité utilisent généralement des bases d'ondes planes car une approche de gaz d'électrons est appropriée pour un solide infini. Cependant pour des calculs moléculaires, des fonctionnelles plus sophistiquées sont nécessaires et une grande variété de fonctionnelles d'échange et de corrélation ont été développées pour des applications chimiques. En physique, la fonctionnelle la plus couramment employée est probablement celle du modèle d'échange révisé par Perdew-Burke-Ernzerhof ; cependant ce n'est pas suffisamment précis au niveau énergétique pour des calculs moléculaires en phase gazeuse. En chimie, une fonctionnelle populaire est connue sous le nom de BLYP (de Becke pour le terme d'échange, et Lee, Yang et Parr pour le terme de corrélation). B3LYP est une fonctionnelle hybride bien plus employée où l'énergie d'échange de Becke est combinée avec l'énergie exacte de la théorie de Hartree-Fock. Les paramètres réglables des fonctionnelles hybrides sont généralement ajustés sur une famille de molécules choisies. Malheureusement, bien que les résultats obtenus avec ces fonctionnelles soient habituellement suffisamment précis pour la plupart des applications, il n'y a aucune manière systématique de les améliorer. Par conséquent dans l'approche courante de la DFT il n'est pas possible d'estimer l'erreur des calculs sans les comparer aux autres méthodes ou aux expériences.

ANNEXE II

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Communications

- Présentation d'un poster au congrès « 9th International Symposium on the synthesis and application of isotopes and isotopically labelled compounds » du 16 au 21 juillet 2006 à Édimbourg.;
- Communication orale (Early Morning Session) et poster au congrès international organisé par l'AFSSET du 3 au 6 septembre 2006, à Paris ;
- Communication orale au congrès international « XIIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins » du 21 au 25 mai 2007, à Istanbul ;
- Communication orale au congrès national organisé par la Société Française de Microbiologie du 30 mai au 1^{ier} juin 2007, à Nantes.

Articles :

Bravin, F., R.C. Duca, M. Pean, O. Puel, M. Delaforge (2006). Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples 3) *Tools for pharmacokinetics and as Internal standard*. Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals (50): 537–538.

Bravin, F., R. Duca, N. Loiseau, M. Pean, O. Puel, M. Delaforge. (2008). Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples. World Mycotoxin Journal 1(3): 275.

ANNEXE III

ARTICLES

Short Research Article

Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples: (3) Tools for pharmacokinetics and as internal standards[†]

FREDERIQUE BRAVIN^{1,*}, MARCEL DELAFORGE¹, RADU CORNELIU DUCA¹, MICHEL PEAN² and OLIVIER PUEL³

¹CEA Saclay, DSV/DBJC/SBFM and URA CNRS 2096, 91 191 Gif sur Yvette Cedex, France

²CEA Cadarache, DEVM/GRAP, St Paul les Durance, France

³INRA, UR 66 Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Toulouse, France

Received 11 July 2006; Revised 21 December 2006; Accepted 24 December 2006

Keywords: mycotoxins; ¹³C-labelling; MSn; zearalenone

Pharmacological studies of exogenous compounds often encounter problems: these compounds are in such infinitesimal amount in their biological matrices, that they require particular detection method. We have implemented an alternative method to the usual radioactivity, based on incorporation of stable isotopes, through the example of biosynthesis of uniformly ¹³C-enriched mycotoxins. The isotopic cluster obtained from a 10% ¹³C enrichment of several mycotoxins (and their metabolites) can be easily recovered from biological tissue samples by mass spectrometry allowing an easy discrimination from natural non-enriched compounds.

We illustrate such pharmacological approaches by *in vitro* zearalenone metabolism. Such enriched compound can also be used as internal standard with high reliability in order to quantify mycotoxins in contaminated food samples.

Results and discussion

Metabolic study of zearalenone (ZEN)

ZEN is known to be metabolized to several metabolites (Figure 1)¹ and some of them have, as ZEN, some endocrine or even carcinogenic effects² which make

their detection and quantification in biological tissues very important. In particular, one of them may be a catechol, structurally close from that formed on estrogen and involved in estrogen-dependent cancers.

In a 30 min incubation at 37°C with ZEN in the presence of microsomes from rats liver treated with phenobarbital (CYP P450s inducer), we can analyze the metabolites profile by HPLC–MS.

As it is shown in Figure 2, the isotopic pattern is conserved for all the metabolites of ZEN, which makes their identification easier in an HPLC–MS analysis. In a similar approach, such isotopic enrichment can be used for quantitative evaluation of transport across biological membranes, and for discriminating in a complete mycotoxin mixture, the relative ability of each component to cross the cellular epithelium layer.

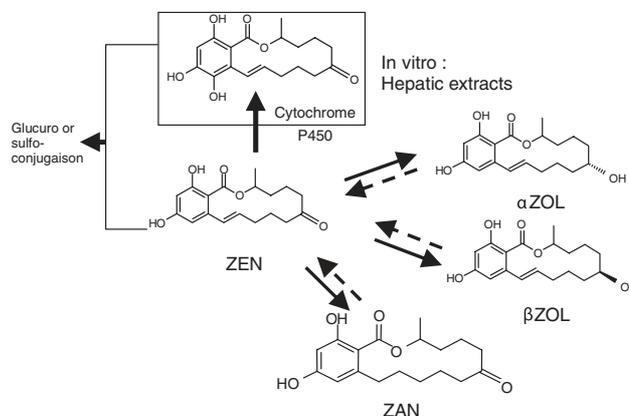


Figure 1 Zearalenone (ZEN) and its metabolites.¹

*Correspondence to: Frederique Bravin, CEA Saclay, DSV/DBJC/SBFM and URA CNRS 2096, 91 191 Gif sur Yvette Cedex, France. E-mail: frederique.bravin@cea.fr

[†]Proceedings of the Ninth International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, Edinburgh, 16–20 July 2006.

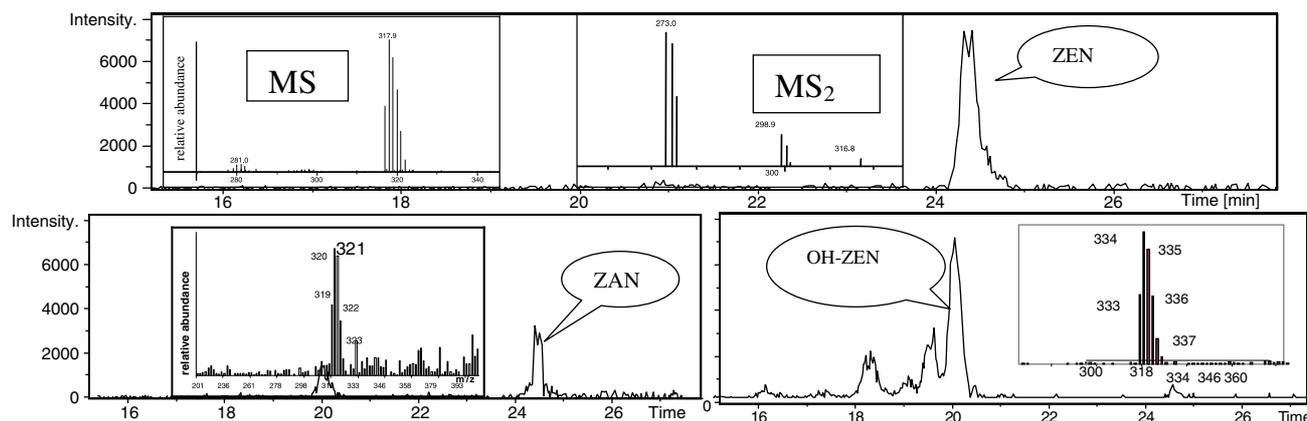


Figure 2 Ion extracted chromatograms of ZEN ($m/z = 319$) and its metabolites ($m/z = 321$ and 335) formed by rat liver microsomes treated with phenobarbital. Figure available in colour online at www.interscience.wiley.com

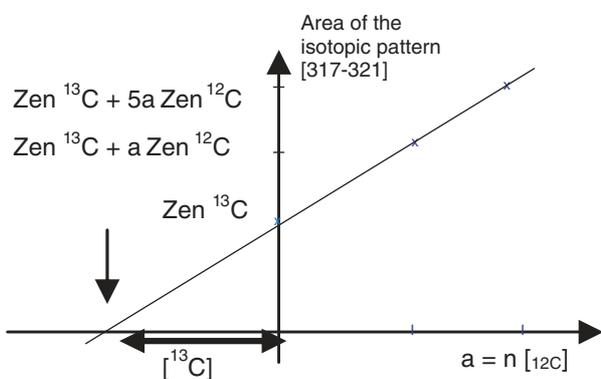


Figure 3 Typical calibration line of ZEN ^{13}C using the additions gauged method (addition of specific quantities of ZEN ^{12}C). Figure available in colour online at www.interscience.wiley.com

Use of $\text{U-}^{13}\text{C}$ labelled molecules as internal standards (IS)

In order to use these enriched molecules as internal standards, we quantified the 10% $\text{U-}^{13}\text{C}$ zearalenone using known amounts of commercial ^{12}C zearalenone (Figures 3 and 4). The deduced concentration of 10% $\text{U-}^{13}\text{C}$ ZEN was approximately 4×10^{-4} mol/L. This compound can thus be used as an internal standard in complex mixture such as wheat seeds or flour without optimization of the extraction process.

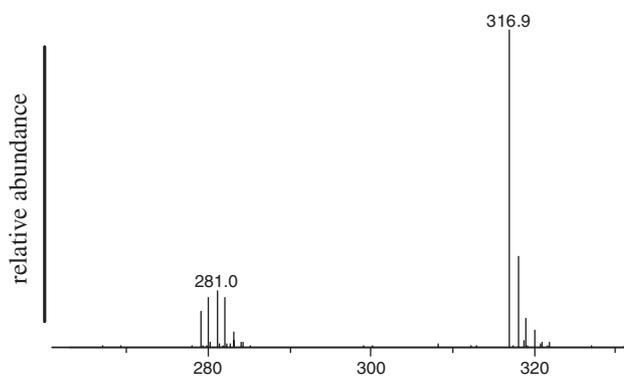


Figure 4 Mass spectrum of ZEN 10% $\text{U-}^{13}\text{C}$ from a raw sample spiked with $0.02 \mu\text{mol}$ of ZEN ^{12}C .

In order to decrease the super-imposition of the MS spectra of the natural and $\text{U-}^{13}\text{C}$ mycotoxins, we are presently trying enrichments of ^{13}C going from 30 to 100%.

REFERENCES

1. Liehr JG, Somasunderam A, Roy D. *Pure Appl Chem* 1998; **70**: 1747–1758.
2. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. *Endocrinology* 1998; **139**: 4252–4263.

Production and use of mycotoxins uniformly enriched with stable isotopes for their dosage in biological samples

F. Bravin¹, R.C. Duca¹, N. Loiseau³, M. Pean², O. Puel³ and M. Delaforce¹

¹CEA, iBiTec-S, URA CNRS 2096, SB2SM, 91191 Gif sur Yvette, France; ²GRAP, SBVME, IBEB, DSV, CEA, CNRS, Aix Marseille Université, 13108 Saint Paul lez Durance, France; ³INRA, UR 66 Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, BP 3, 31931 Toulouse Cedex, France; marcel.delaforce@cea.fr

Received: 27 June 2007 / Accepted: 20 March 2008

© 2008 Wageningen Academic Publishers

Abstract

Due to their low concentrations in biological matrices, mycotoxin analyses often encounter detection and quantification problems, especially for toxicokinetic studies. We have developed a strategy to produce in a single process, several fungi secondary metabolites uniformly enriched with ¹³C, ¹⁵N stable isotopes in their 'natural' composition. This includes: (1) a plant culture in the presence of 10%, 50% or 100% ¹³CO₂ as the only source of carbon, and in the presence or not of 10% ¹⁵N-enriched nitrogen salts – as expected wheat or maize uniformly incorporate enriched isotopes into their bioproducts; (2) a subsequent solid culture of different filamentous fungi on plant biomass led to the production of a 'natural' mixture of isotopes-enriched mycotoxins – these compounds exhibit a characteristic isotopic cluster, which can be easily detected by mass spectrometry. As an example, we achieved 10% uniformly ¹³C-enriched zearalenone, deoxynivalenol and mycophenolic acid by growing *Fusarium graminearum* or *Penicillium brevicompactum* on 10% ¹³C enriched wheat seeds and 3 to 10% ¹³C, ¹⁵N uniformly enriched fumonisins from *Fusarium verticillioides* cultures on maize seeds or straw. These compounds were used for metabolism and transport studies in mammals either *in vitro* or *in vivo* and analysed by MS and MSn spectra of the isotopic cluster but also by ¹³C, ¹⁵N NMR. Moreover, such isotopic pattern enrichment can be used for quantitative evaluations of mycotoxins transport across mammalian biological membranes, alone or in their 'natural' conditions in the presence of other fungi secondary metabolites. Finally, we used such enriched compounds with high reliability in order to study zearalenone metabolism but these enriched compounds would also be used as internal standards to quantify zearalenone or fumonisins in contaminated food samples.

Keywords: secondary metabolites; uniform stable isotope enrichment; mass spectroscopy; metabolism; quantification and identification

1. Introduction

Micro-organisms are omnipresent in our environment – about several million – and exhibit a great ability to adapt to the medium on which they develop. The preferential use of nutrients can explain, under natural conditions, the diversity and the extreme variability of the products synthesised and / or secreted by these micro-organisms. Among these compounds, the mycotoxins belong to the low-weight molecular secondary metabolites whose

physiological role is not clearly elucidated. The methods most commonly used for the study of the mycotoxins in a laboratory involve growing cultures on agar or on liquid medium, and so in many cases, the secreted mycotoxins differ qualitatively and quantitatively from those produced on solid natural substrate or under natural conditions. These differences in production explain divergent effects observed during animal or human exposures to these fungi or their secreted products. In the same way, the production of these toxins varies extremely with *in vitro*

culture conditions. Knowledge about these toxins and their effects are safety priorities among the national and international health authorities.

The range of products secreted by fungi is very large: some of these compounds have no effect on health or have therapeutic activities whereas others have toxic effects. Thanks to the great diversity of fungi species, compounds with a broad spectrum of therapeutic activities such as antibiotics, immuno-modulators (cyclosporin, mycophenolic acid) or vasodilators (derivatives of the ergot alkaloids) have been discovered. However, these same micro-organisms are also able to produce compounds toxic to humans or mammals, either short-term poisons such as derivatives of zearalenone (an endocrine disturber), or long-term poisons such as carcinogenic compounds (aflatoxin B₁ or ochratoxin A).

The number of products referred to as mycotoxins remains, however, low (less than hundred) compared to the thousands of low-weight molecular products called 'secondary metabolites' (Bennett and Klich, 2003) that are synthesised by these micro-organisms and that can be found in human or animal food. Several dozen different compounds are usually found in a simple fungal extract. These various secondary metabolites, including mycotoxins, are all very complex to analyse and quantify because they occur in mixtures varying according to the fungi strain, nutriment, humidity or temperature.

Moreover, even if the different components of these secreted compounds are not systematically noxious, they can be metabolised by some of the host enzymes into more toxic compounds. These enzymes, primarily hepatic cytochromes P450 in the mammals, ensure the oxidation of many hydrophobic exogenous compounds, increasing their polarity and thus assuring their biliary or urinary elimination. This transformation can involve a reduction of the parental compound toxic effects (reduction of ergotism by oxidation of the ergot alkaloids, for example (Peyronneau *et al.*, 1994)) or, in other cases, can involve a toxic activation, as in the case of aflatoxins (Isin and Guengerich, 2007).

Consequently, studies of the compound occurring in organisms are often difficult. We have implemented an alternative method to the usual radioactivity method, based on incorporation of stable isotopes, using the example of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched mycotoxins biosynthesis. We previously showed, by using a 10% ¹³CO₂ enrichment, the feasibility of producing mycotoxins by using cereals uniformly enriched (U-¹³C) as the only source of carbon for *F. graminearum* growth on a solid medium (the enriched corn). From this material, we were able to produce several milligrams of zearalenone and mycophenolic acid U-¹³C and showed the interest of uniform enrichment in zearalenone metabolism and transport studies (Yen *et al.*, 2006).

The isotopic cluster obtained from 10%, 38% and 75% ¹³C uniform enrichments of mycophenolic acid and zearalenone (and its metabolites) can be easily differentiated in biological tissue samples by mass spectrometry allowing an easy discrimination from natural non-enriched compounds. We illustrate such pharmacological approaches by *in vitro* natural, 10%, 38% and 75% U-¹³C zearalenone (ZEA) metabolism. Using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) coupled with Mass Spectroscopy (MS) we followed their metabolism at pH 4.5 (where the main metabolite formed is α-zearalenol: α-ZOL) and at pH 7.4 (where the main metabolite formed is β-zearalenol: β-ZOL), (Malekinejad *et al.*, 2005).

By comparing the experimental with the theoretical mass spectra of the different enriched mycotoxins, we calculated the real enrichment of zearalenone and mycophenolic acid, in order to evaluate a possible isotopic effect during either fungi bioformation or biotransformation in mammalian preparations. Finally, such enriched compounds can also be used as very reliable internal standards to quantify mycotoxins in contaminated food samples.

2. Materials and methods

Chemicals and reagents

Zearalenone, mycophenolic acid, NADPH, acetonitrile, Glucose-6-Phosphate and MgCl₂ were purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). All reagents were of analytic grade and of the highest purity available.

Production of double ¹³C and ¹⁵N isotope enriched plants and uniformly ¹³C labelled mycophenolic acid and zearalenone production

To perform uniform enrichment with ¹³C, plants were grown in hermetically sealed chambers for a complete growth cycle i.e. several weeks or months. Seeds were sown in pots containing vermiculite or perlite. Vermiculite or perlite are used to limit soil respiration which releases carbon dioxide with about 1% natural ¹³C leading to a decrease of ¹³C enrichment level. The pots were placed in air-tight chambers (750 l for wheat and 2150 l for maize) in which gas composition and environmental parameters (photoperiod, photon flux rate, night and day temperatures and relative humidity) were precisely regulated. CO₂ concentration in the chamber was continuously monitored with an infra-red analyser. During light periods and after the flowering period, CO₂ concentration was maintained at 360 μl/l by automatic injections of concentrated CO₂ enriched at 10%, 50% or 100% ¹³C to compensate for photosynthetic assimilation. The wheat plants were automatically watered with nutrient solution containing only ¹⁴N nitrate and ammonium salts since none of the mycotoxins that we wanted to produce contained a nitrogen

atom, making it unnecessary to enrich seeds with ^{15}N . In contrast, in order to produce fumonisins, maize cultures (*Zea mays*, Antares strain) were grown in the presence of ^{15}N enriched nitrogen salts.

Zearalenone production was carried out using autoclaved ^{12}C or ^{13}C -enriched wheat (*Triticum aestivum*, Caphorn strain) as the only nutrient source for the fungi (Llorens *et al.*, 2004). Wheat grains were moistened with sterile distilled water for 4 days at 4 °C (to reach a water activity a_w of 0.98), before a 20 minute sterilisation period at 120 °C. Approximately 30 g of grains were distributed into a 140 mm diameter Petri dish. Each Petri dish was inoculated with a 2×10^5 conidia suspension of *Fusarium culmorum* from the G₅G₇ strain and incubated at 25 °C for 30 days (Yen *et al.*, 2006).

Mycophenolic acid production was carried out using the same procedure except that moistened wheat seeds (water activity $a_w = 0.98$) were inoculated with a conidia suspension of *Penicillium brevicompactum* from the NCPT 10 strain or *Byssoschlamys nivea* NRRL 2615 strain and incubated at 25 °C for 13 days (Bartman *et al.*, 1981; Puel *et al.*, 2005).

Finally, mycotoxin extraction was carried out with chloroform 100% or $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 for mycophenolic acid or zearalenone, respectively.

Rat liver microsomal incubations with zearalenone

Phenobarbital-treated rat liver microsomes (1 μM) were incubated with a NADPH-generating system (1 mM NADP + 10 mM Glucose-6-Phosphate), 10 mM G₆PDH, 100 μM MgCl_2 and zearalenone (50 μM) for 30 minutes at 37 °C in 500 μl 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). At pH 4.5 incubations were performed with 0.5 mM NADPH, in 500 μl 0.1 M citrate buffer. Control incubations without microsomes or without the NADPH-generating system (or NADPH) were performed in parallel. Incubations were terminated by the addition of 500 μl cold acetonitrile and stored for a few minutes at -20 °C and then at 4 °C. After centrifugation at 10,000 rpm for 10 minutes, the supernatants were stored at -20 °C until analysis.

HPLC and mass spectrometry analysis

A solid phase extraction procedure was used for purification of both zearalenone and mycophenolic acid ^{13}C solutions. Raw sample solutions were 1/3 diluted with water and then passed through a 10-mg Oasis solid-phase extraction cartridge (Waters, Milford, MA) previously activated with acetonitrile. The cartridge was rinsed with 2 ml water/acetonitrile (90/10, v/v). Mycophenolic acid and zearalenone were then eluted with 1 ml acetonitrile. The

extracts were evaporated to dryness and reconstituted in 150 μl of water/acetonitrile (50/50, v/v).

Zearalenone and mycophenolic acid analyses were carried out using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with mass spectroscopy. The HPLC unit (Agilent instruments, CA, US) was fitted with a 150 \times 2 mm Kromasil 5 μm C18 column (Interchim, France) and a diode-array detector (DAD). The solvent system was composed of 10 mM ammonium acetate in water:acetonitrile (90/10 v/v) as solvent A for zearalenone analysis, 0.1% formic acid in water:acetonitrile (90/10 v/v) as solvent A for mycophenolic acid analysis respectively), and water:acetonitrile (10/90 v/v) as solvent B. The toxins were eluted by starting from 10% of solvent B for 2 minutes, followed by a linear gradient up to 80% solvent B within 22 minutes. After an isocratic elution for 2 minutes, the gradient was decreased to 10% solvent B within 2 minutes.

Sample extracts were kept at 4 °C until analysis. A volume of 20 μl was injected into the chromatographic system. The column flow rate was 0.2 ml/min and the column temperature was kept at 25 \pm 5 °C. The probe temperature was 330 °C and the probe voltage was 4500 V as well in the negative ion mode (for ZEA) as in the positive ion mode (for MPA). The nebuliser gas pressure was set at 40 psi. Dry gas flow rate was set at 9 l/min. The focusing potential was set at 3.50 kV. The maximal dwell time was set at 100 ms. Data acquisition and processing were performed using DataAnalysis Software 3.2 (Bruker Daltonics esquire 5.2).

Mass spectra prediction and enrichment calculation

For a molecule $\text{C}_n\text{N}_p\text{O}_q\text{H}_r$, with nominal mass M , enriched with known percentages of different natural isotopes (x ^{13}C , y ^{15}N , t ^{18}O and w ^2H), the prediction of its mass distribution spectrum relies on probability calculations and, moreover, on the binomial law. The presence of different peaks at $M+1$, $M+2$ etc. is related to the number of ^{13}C , ^{15}N , ^2H or ^{18}O atoms held in the molecule and their intensities are linked to the isotopes distribution among the molecule atoms.

For example, the distribution of x ^{13}C among n carbons in an only ^{13}C enriched molecule, is given by the probability of having k carbons ($k < n$) among the n of the molecule with an enrichment of x ^{13}C (Equation 1):

$$P(X=k) = C_n^k \cdot x^k \cdot (1-x)^{(n-k)} \quad (1)$$

More generally, for a multiple enriched molecule, the $M+k$ peak intensity is given by the following formula (Equation 2):

$$P_{k/N} = \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q \sum_{l=0}^r P_1(k-i-l-2j) \times P_2(i) \times P_3(j) \times P_4(l) \quad (2)$$

With:

$P_1(k - i - l - 2j) = C_n^{k-i-2j-l} x^{k-i-2j-l} (1 - x)^{n-k+i+2j+l}$; probability of having $k - i - l - 2j$ ^{13}C among n carbons;

$P_2(i) = C_p^i y^i (1 - y)^{p-i}$; probability of having i ^{15}N among p nitrogens;

$P_3(j) = C_q^j t^j (1 - t)^{q-j}$; probability of having j ^{18}O among q oxygens;

$P_4(l) = C_r^l w^l (1 - w)^{r-l}$; probability of having l ^2H among r hydrogens.

In doing the reverse calculation using an algorithm not described here (Bravin et al manuscript in preparation), we are able to determine the enrichments in ^{13}C , ^{15}N , ^2H or ^{18}O of a known molecule only from its experimental mass spectra.

3. Results and discussion

Mass spectra: comparison between experimental and theoretical enriched mycotoxins spectra

The ^{13}C isotopic enrichments were directly measured on the wheat seeds by combustion and isotopic separation and were respectively estimated at about 38% and 75% for the initial 50% and 100% $^{13}\text{CO}_2$ enrichments. This lower enrichment is due to the $^{13}\text{CO}_2$ application only at the end of the period of flowering of wheat, i.e. at the beginning of grain filling. It was speculated that, in contrast to outside field cultures, there was only low carbon remobilisation from leaves or straw to the ear in artificial conditions (Gebbing *et al.*, 1999). Our results indicate that

remobilisation also occurs in our culture conditions. This point must be taken into account in further experiments.

In order to evaluate the ^{13}C enrichments of different fungi secondary metabolites and compare them to the initial and known wheat seed ^{13}C enrichments, we recorded the experimental spectra of zearalenone (ZEA) and mycophenolic acid (MPA) produced from natural abundance, 10%, 38 or 75% ^{13}C wheat preparations. We then compared the experimental mass spectra with the expected theoretical spectra and we calculated the ^{13}C enrichments corresponding to the experimental mass distribution. Discrepancy between these two sets of values primarily indicates a non-random ^{13}C distribution in wheat.

The estimated MPA ^{13}C enrichments deduced from the experimental intensities of the mass spectra (normalised) were found to be 75% ^{13}C for MPA produced on the wheat seeds initially enriched with 75% $^{13}\text{CO}_2$, and 37% ^{13}C for MPA produced on the 38% ^{13}C wheat seeds (Figure 1). On the other hand, we found a strong correlation between the experimental and the theoretical mass spectrum for natural and 10% ^{13}C MPA. Concerning the 38% and 75% MPA, a single mass spectrum cluster was obtained either on the MS or collision fragments (MS_2), indicating a uniform ^{13}C distribution in MPA and, consequently, in the initial biomass wheat seeds.

In addition, it is interesting to consider the relative intensity of the nominal peak on the different spectra: the m/z 320.9

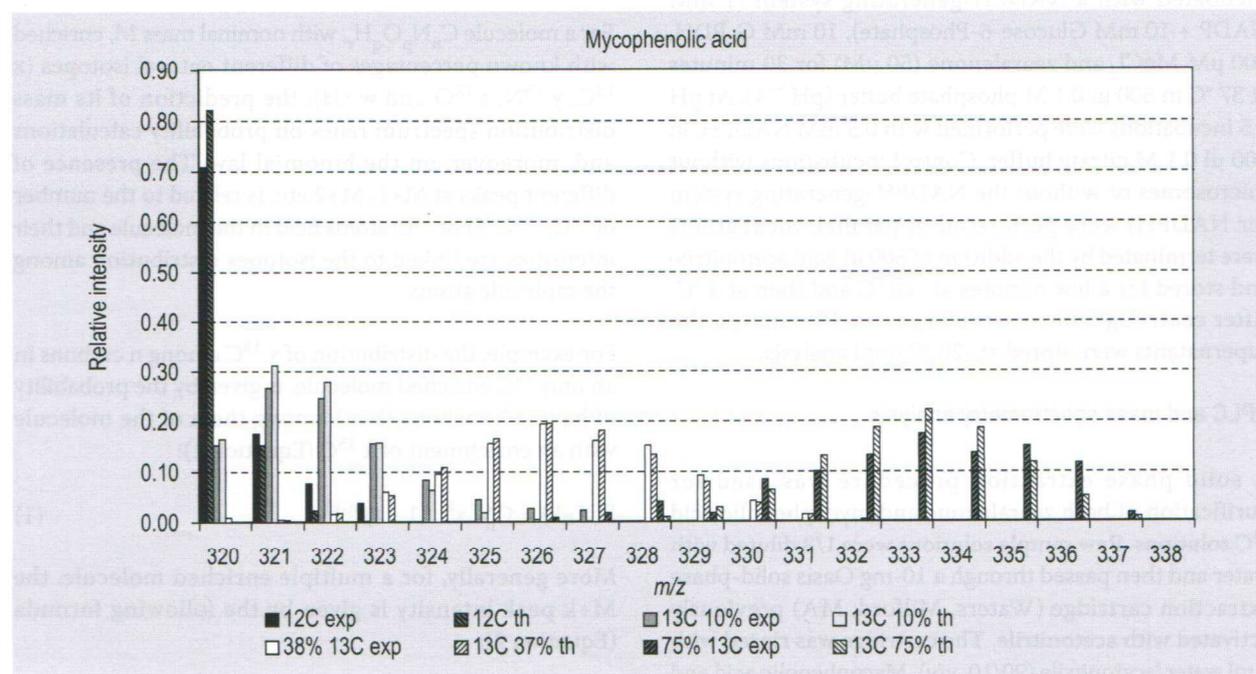


Figure 1. Comparison between mycophenolic acid experimental and theoretical mass spectra (spectra are adjusted to mycophenolic acid nominal mass).

peak intensity (MPA nominal peak) is respectively 75, 15, 0.9 and 0% for the natural abundance, 10%, 37% and 75% ¹³C enrichments. This means, as determined by probability predictions, that the more MPA is enriched, the less intense is its nominal peak intensity. As a consequence, the mass spectrum of 37 or 75% ¹³C MPA used as an internal standard is entirely distinguishable from the natural MPA spectrum, making quantitative analysis easier. Similarly, considering the I_{12C}/I_{max} ratios, they are found to be 57%, 4% and 0% for the 10%, 37% and 75% ¹³C enrichments, respectively.

In addition, to evaluate the difference between the experimental and the calculated mass spectra, the main peak intensity of the theoretical and the experimental spectra (m/z 327 for 37% ¹³C MPA; 334 for 75% ¹³C MPA), are superimposed and adjusted: the average of the absolute deviation between peak intensities of the other peaks of the cluster is less than 10%. Thus, by our enrichment determination program we found values close to the ¹³C seed enrichments which means that there would be no isotopic discrimination coming from the micro-organism (*Penicillium brevicompactum*) MPA biosynthesis; at least, if there is discrimination between ¹²C and ¹³C, it would be lower than 2%.

In contrast, despite the fact that they are not in full agreement with 38 and 75% ¹³C wheat seeds enrichments, ZEA mass intensity distributions correspond to the expected theoretical mass distributions for natural ZEA (1.08% of ¹³C) and for 10% ¹³C ZEA. We obtained slightly

higher values for ZEA from 38 and 75% ¹³C wheat seeds: 39% and 81% of ¹³C respectively, these values fitting perfectly with the 38% and 81% ¹³C ZEA theoretical mass distributions (Figure 2).

If confirmed, such increases would mean that an isotopic preference for the ¹³C isotope nutrient is done by the micro-organism (*Fusarium culmorum*) during the synthesis of ZEA. These results have to be confirmed by other productions of ¹³C enriched ZEA.

In vitro incubations of n% U ¹³C ZEA with liver mammalian enzymatic systems

In every case, in order to estimate the advantage of using ¹³C enriched molecule in metabolism studies and to assess a possible discrimination between ¹²C and ¹³C during metabolism phases, we carried out experiments on different ¹³C enriched ZEA. Its metabolites are well known (Kiessling and Pettersson, 1978). We chose to follow α -zearalenol (α -ZOL) formation by mass spectrometry and checked its ¹³C enrichment:

As the mass spectra show (Figure 3), α -ZOL exhibits in all cases the same enrichment as the starting ZEA. In the four spectra, we can see the same shift between the nominal peak (molecules only composed of ¹²C) and the main peak either for ZEA or for α -ZOL: an average value of 2 for 10% ¹³C enrichment (among 18 carbon atoms, 2 are ¹³C), 7 for 39% ¹³C enrichment (7 ¹³C/ 18 C) and 14 for 81% ¹³C enrichment (14 ¹³C/ 18 C).

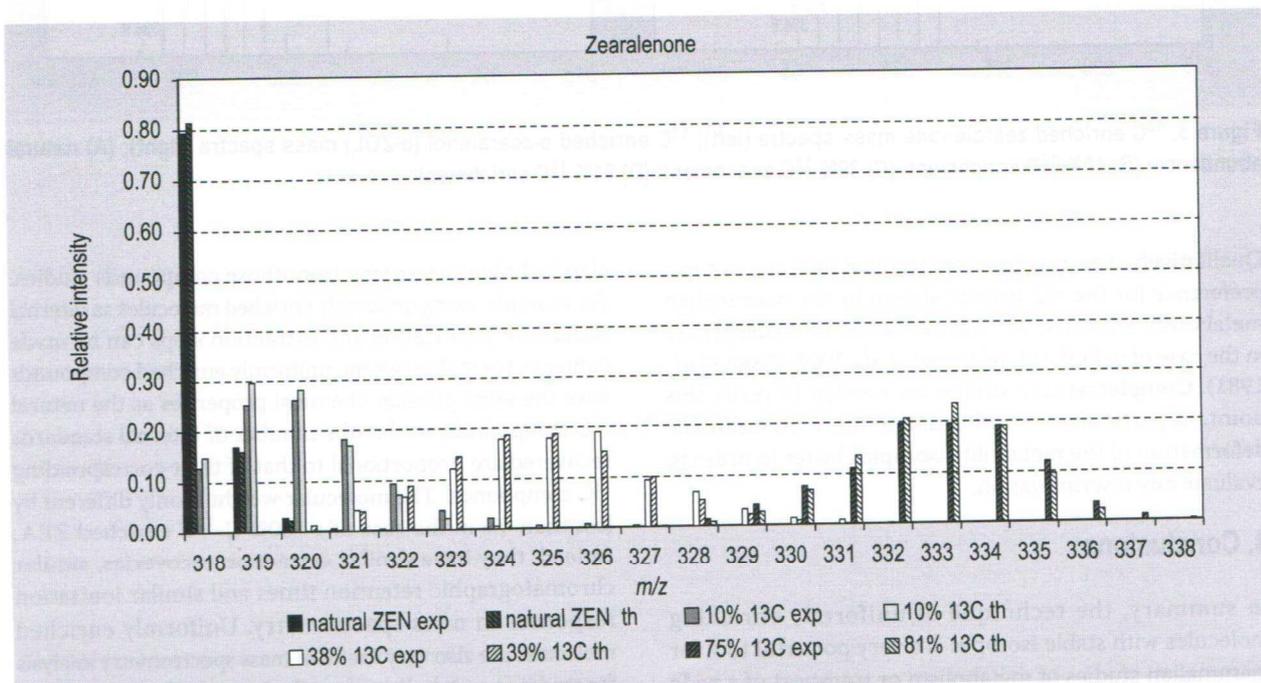


Figure 2. Comparison between zearalenone experimental and theoretical mass spectra (spectra are adjusted to zearalenone nominal mass).

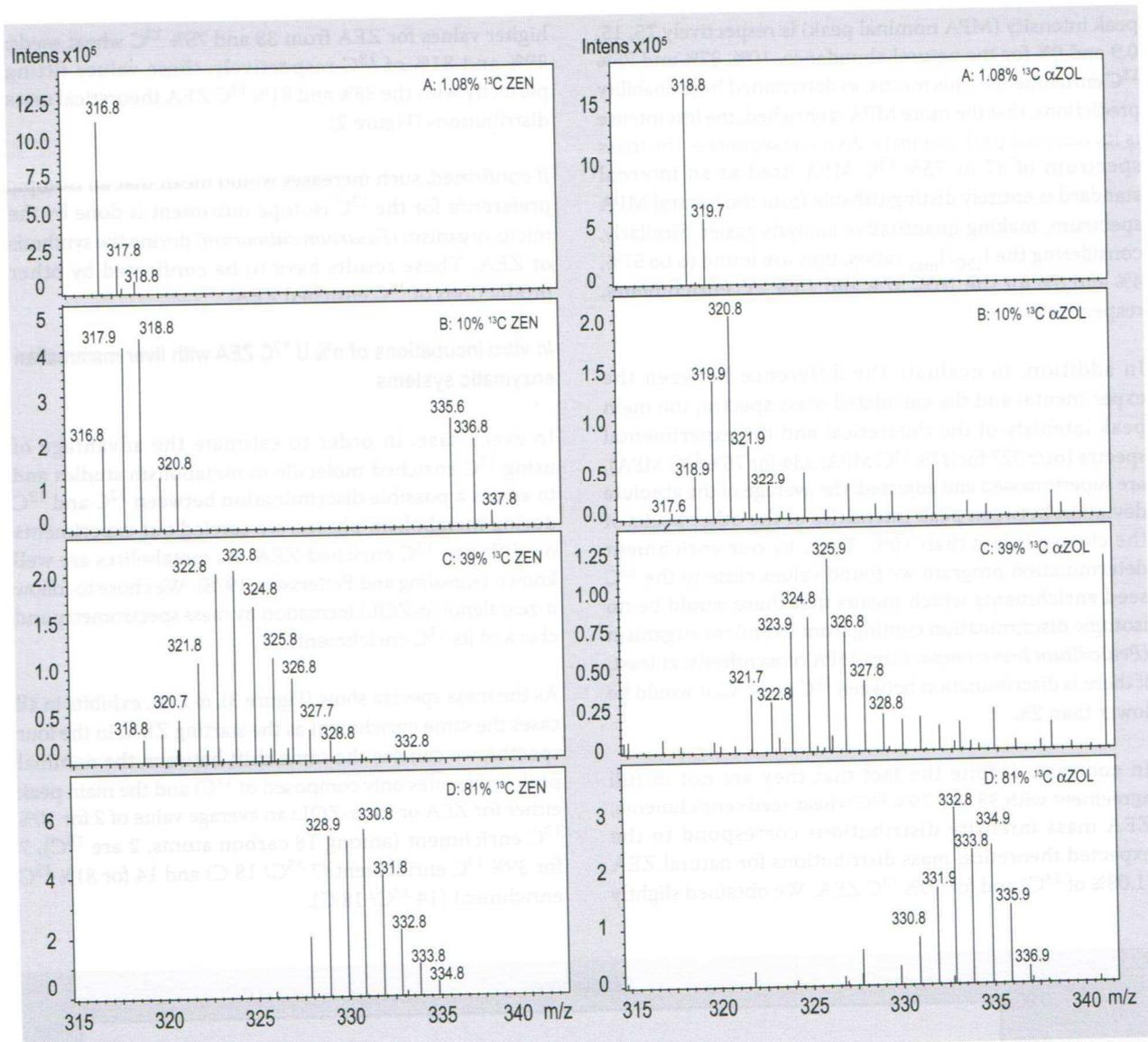


Figure 3. ^{13}C enriched zearalenone mass spectra (left); ^{13}C enriched α -zearalenol (α -ZOL) mass spectra (right); (A) natural abundance; (B) 10% ^{13}C enrichment; (C) 39% ^{13}C enrichment; (D) 81% ^{13}C enrichment.

Qualitatively, it seems that there would not be any isotopic preference for the ^{13}C isotope shown by the mammalian metabolism enzymes, 3α -hydroxysteroid deshydrogenase in the case of α -ZOL (Malekinejad *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 1981). Complementary studies are needed to verify this point, in particular we will estimate more precisely the deformation of the metabolite isotopic cluster in order to evaluate any discrimination.

4. Conclusions

In summary, the technique of uniformly enriching molecules with stable isotopes is a very powerful tool for mammalian studies of metabolism or transport of a wide variety of natural compounds and among them micro-organisms' secondary metabolites. It circumvents many

classic difficulties arising from those compounds studies. For example, using uniformly enriched molecules as internal standards, purification and extraction steps can be made lighter as the stable isotope uniformly enriched compounds have the same physico-chemical properties as the natural ^{12}C compounds, so that the number of internal standards recovered are proportional to that of their corresponding ^{12}C compounds. The molecular weight is only different by less than 6% in the case of a 100% U- ^{13}C enriched ZEA. Indeed, they have similar extraction recoveries, similar chromatographic retention times and similar ionisation responses in mass spectrometry. Uniformly enriched molecules are also very useful in mass spectrometry analysis for studying metabolism since the isotopic cluster signature is preserved for all the enriched compounds metabolites. In addition, our method allows us to prepare crude extracts

containing all the secondary metabolites in the same composition as their natural production.

Several points had to be solved before developing the large-scale production of such mycotoxins either alone or in crude extracts. This includes in particular isotopic effects in the plant exposed to $^{13}\text{C}\text{O}_2$, in the micro-organism and finally in the studied mammalian targets. As we have shown in this paper, exact knowledge about plant initial isotopic enrichment is not an absolute prerequisite since we are able to calculate the final enrichment of the micro-organism secondary metabolite studied from mass spectra derived from two enrichments. We are able, however, to produce, by choosing the plant and the fungi, many different $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ natural compounds (zearalenone, deoxynivalenol, mycophenolic acid, fumonisins B₁, B₂, B₃, fumitremorgins, verruculogen, patulin, sterigmatocystin or ergot alkaloids). We are then able to determine their isotopic enrichments, purify them and then use them as an internal standard for quantification in contaminated samples or to perform metabolism or transport studies in mammals including humans.

Although it seems that a ^{13}C isotopic effect may occur (Miron *et al.*, 2006), albeit to a lesser extent than deuterium enrichment known for its isotopic effects and exchange (Stokvis *et al.*, 2005), stable isotope enrichments do not influence the compound action mode, meaning that the measured activity or metabolism is totally reliable.

Recently, Georg Häubl from the University of Natural Resources and Applied Life Sciences (Center for Analytical Chemistry, Department for Agrobiotechnology, Tulln) in Austria used a similar approach to prepare fully enriched internal standards (99% ^{13}C). Such compounds exhibit, in their mass spectrum, one single peak and not an isotopic cluster. There have been other approaches with chemical hemisynthesis of mycotoxins (DON, Sigma), but their use is, in fact, limited to a single mycotoxin detection. However, in our preparation scheme, all the mycotoxins bear the same ^{13}C enrichment; e.g. 10% ^{13}C fumonisins B₁, B₂ and B₃ are in a single culture of *F. moniliforme* on maize.

Lastly, since we use natural isotopes vs. radio-labelled compounds, such enriched molecules can be used for human drug or steroid pharmaco-kinetics studies and for clinical studies (Baume *et al.*, 2006; Setchell *et al.*, 2003).

References

- Bartman, C.D., Doerfler, D.L., Bird, B.A., Remaley, A.T., Peace, J.N. and Campbell, I.M., 1981. Mycophenolic Acid Production by *Penicillium brevicompactum* on Solid Media. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 729-736.
- Baume, N., Saudan, C., Desmarchelier, A., Strahm, E., Sottas, P.E., Bagutti, C., Cauderay, M., Schumacher, Y.O., Mangin, P. and Saugy, M., 2006. Use of isotope ratio mass spectrometry to detect doping with oral testosterone undecanoate: inter-individual variability of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio. *Steroids* 71: 364-370.
- Bennett, J.W. and Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516.
- Gebbing, T., Schnyder, H. and Kuhbauch, W., 1999. The utilization of pre-anthesis reserves in grain filling of wheat. Assessment by steady-state $^{13}\text{C}\text{O}_2/^{12}\text{C}\text{O}_2$ labelling. *Plant, Cell & Environment* 22: 851-858.
- Häubl, G., Freudenschuss, M., Krska, R., Jaunecker, G. and Binder, E., 2006. Production of highly isotopically labelled, secondary, microbial metabolic products, and corresponding metabolic products. Patent WO/2006/105563.
- Isin, E.M. and Guengerich, F.P., 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770: 314-329.
- Kiessling, K.H. and Pettersson, H., 1978. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 43: 285-290.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Logrieco, A. and Jimenez, M., 2004. Influence of the Interactions among Ecological Variables in the Characterization of Zearalenone Producing Isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 253-260.
- Malekinejad, H., Maas-Bakker, R.F. and Fink-Gremmels, J., 2005. Enzyme kinetics of zearalenone biotransformation: pH and cofactor effects. *Archives of Toxicology* 79: 547-553.
- Miron, M., Leticia, L., Herrera, M., Gerardo, L., Ramirez, P., Hobson, N. and Keith, A., 2006. Effect of diet quality on carbon and nitrogen turnover and isotopic discrimination in blood of a New World nectarivorous bat. *Journal of Experimental Biology* 209: 541-548.
- Olsen, M., Pettersson, H. and Kiessling, K.H., 1981. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 48: 157-161.
- Peyronneau, M.A., Delaforge, M., Riviere, R., Renaud, J.P. and Mansuy, D., 1994. High affinity of ergopeptides for cytochromes P450 3A. Importance of their peptide moiety for P450 recognition and hydroxylation of bromocriptine. *European Journal of Biochemistry* 223: 947-956.
- Puel, O., Tadrast, S., Galtier, P., Oswald, I.P. and Delaforge, M., 2005. *Byssoschlamys nivea* as a Source of Mycophenolic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 550-553.
- Setchell, K.D.R., Faughnan, M.S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N.M., Wolfe, B.E., Brashear, W.T., Desai, P., Oldfield, M.F., Botting, N.P. and Cassidy, A., 2003. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ^{13}C -labeled tracers in premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 77: 411-419.
- Stokvis, E., Rosing, H. and Beijnen, J.H., 2005. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 401-407.
- Yen, S., Pean, M., Puel, O., Loiseau, N., Andre, F. and Delaforge, M., 2006. Metabolism of mycotoxins in mammalian cells: Advantage of a stable isotopic enrichment strategy. In: Njapau, H., Trujillo, S., van Egmond, H. and Park, D. (eds.) *Mycotoxins and phycotoxins*. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, pp. 185-193.