

MUMYCEL

Incidence de la **Multi-contamination** aux **MY**cotoxines de *Fusarium* sur **CELL**ules humaines :
évaluation de la cytotoxicité et approche toxicoprotéomique.

Description du projet :

Problématique

Les céréales représentent la ressource la plus importante de l'alimentation humaine et animale au monde. Selon les prévisions de l'organisation pour l'alimentation et l'agriculture des Nations Unies (FAO), la production annuelle de céréales devrait augmenter d'un milliard de tonnes, ce qui est susceptible d'entraîner des problèmes de sécurité alimentaire, en particulier concernant les contaminations microbiologiques, puisque l'utilisation mondiale de pesticides, en particulier fongicides, a considérablement ralenti et les prévisions confirment cette tendance. La France est le premier producteur et exportateur européen de céréales et la production céréalière est une composante importante de l'économie agricole de la région Bretagne (3,4 millions de tonnes de céréales produites en 2010-2011, 5 millions de tonnes de céréales transformées pour la nutrition animale et 38000 emplois – Passion Céréale, 2012).

Dans les microorganismes contaminant les céréales, certaines espèces de champignons (*Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*) sont toxinogènes. En France, *Fusarium* spp. sont les espèces les plus problématiques en raison de leur prévalence, leur écologie, leur physiologie et de la large gamme de mycotoxines (appelées fusariotoxines) produites (Loos et al., 2004). Parmi les fusariotoxines, trois familles sont particulièrement importantes en raison de leur grande toxicité et de leur incidence dans les produits agricoles européens: les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone.

L'exposition chronique à de faibles doses de mycotoxines pendant de longues périodes induit des pathologies graves dues à leur pouvoir hépatotoxique, cancérigène, neurotoxique... (AFSSA, 2009). La gravité des effets dépend de la durée d'exposition, des doses et des combinaisons de toxines. Les espèces de *Fusarium* sont capables de produire simultanément différentes mycotoxines ; de plus, les matrices peuvent être contaminées par plusieurs espèces de champignons à la fois. La coprésence de mycotoxines dans les céréales est une situation courante. Par exemple, 95 % des grains de maïs récoltés en France pour la période 2004-2006, ont été multi-contaminés : 3 % ont été contaminés par des trichothécènes et la zéaralénone, 30 % par les trichothécènes et fumonisines et 65 % par les trois familles de fusariotoxines (Arvalis, données non publiées). La présence de ces multi-contaminations en mycotoxines pose un problème à la fois en terme de sécurité alimentaire et de réglementation. En sécurité alimentaire, il est important de comprendre l'interaction entre les différentes mycotoxines pour déterminer si les effets sont additifs, synergiques ou antagonistes. En terme de réglementation, la contamination par les mycotoxines jusqu'ici a toujours été établie sur la base d'une mycotoxine considérée individuellement. C'est encore le cas dans la réglementation européenne (Règlement UE 1881/2006). Le manque de considération réglementaire sur les multicontaminations des céréales et produits céréaliers est principalement dû à la rareté des données toxicologiques et des données sur l'effet global de combinaisons de mycotoxines sur les mécanismes cellulaires.

Dans ce projet, nous proposons donc de mieux caractériser l'incidence de la présence simultanée de mycotoxines, dans des conditions aiguës et chroniques ainsi que les mécanismes impliqués (cytotoxicité, protéomique, transcriptomique), afin d'obtenir une meilleure appréciation du risque « mycotoxines » dans les céréales.

Le prérequis pour un tel projet est de déterminer les mycotoxines et les associations de mycotoxines à étudier. Nous concentrerons notre travail sur les fusariotoxines en étudiant les mélanges de mycotoxines majeures. Nous favoriserons l'association des mycotoxines produites par les mêmes espèces de *Fusarium*.

	Type of cereals and <i>Fusarium</i> species							
	Wheat		Barley	/ Wheat			Maize	
	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i>	<i>F. sporotrichoides</i>	<i>F. langsethiae</i>	<i>F. avenaceum</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>
Major mycotoxin								
Deoxynivalenol (type B trichothecene)	X	X						
Nivalenol (type B trichothecene)			X					
Diacetoxyscirpenol (type A trichothecene)			X					
T-2 toxin (type A trichothecene)			X	X	X			
Zearalenone	X	X						
Fumonisin							X	X

Tableau 1 : Mycotoxines majeures produites par différentes espèces de *Fusarium* (AFSSA, 2009)

Tâche 1 : Effet de l'exposition aiguë et chronique de combinaisons de mycotoxines sur cellules Caco-2 et HepaRG : aspect cytotoxique

Dans le projet proposé, la toxicité des combinaisons de mycotoxines sera évaluée après exposition aiguë et chronique en utilisant des modèles cellulaires *in vitro*. Bien que les lignées cellulaires puissent se comporter différemment des cellules primaires, il n'est pas toujours facile et/ou possible d'avoir accès à des cultures primaires. Dans ce contexte, nous proposons d'utiliser la lignée humaine intestinale épithéliale cellulaire (Caco-2) puisque, dans un contexte de nourriture contaminée, l'épithélium intestinal constitue la première barrière de défense de l'hôte et ces cellules participent activement à la réponse immunitaire (Oswald, 2006). Nous utiliserons aussi une lignée cellulaire d'hépatocyte humain, HepaRG, puisque le foie constitue le siège de la conversion métabolique des aliments et des molécules toxiques.

Il est bien connu que les fumonisines et DON (trichothécène la plus répandue) modifient les cellules épithéliales intestinales (Bouhet et al., 2006). Très peu de données existent sur l'exposition chronique aux mycotoxines sur des Caco-2 (Van De Walle et al., 2010). Nous évaluerons donc l'effet des fusariotoxines, seules et en combinaison, après une exposition à long terme sur les Caco-2. D'autre part, les hépatocytes humains HepaRG, constituent un bon modèle d'étude du métabolisme hépatique en toxicologie (Guillouzo et al., 2007) et nous permettront de nous rapprocher des conditions *in vivo* réelles.

Dans la tâche 1, deux paramètres seront suivis : **i)** la prolifération cellulaire et la perméabilité de la monocouche cellulaire et **ii)** la sécrétion de protéines après une exposition aiguë ou chronique.

Tâche 2 : Effet de combinaisons de mycotoxines sur cellules Caco-2 et HepaRG : aspect moléculaire

En parallèle de l'étude toxicologique, des approches de protéomique et de transcriptomique seront utilisées afin d'élucider les mécanismes et les voies cellulaires impliquées suite à une exposition aux mycotoxines. Les protéines impliquées dans la réponse au stress engendré par les mycotoxines peuvent représenter des cibles d'intérêt pour élucider les réactions cellule cible/molécules toxiques. Les résultats devraient apporter de nouveaux éléments pour l'évaluation des risques associés à l'exposition des consommateurs aux mycotoxines. Ces analyses fonctionnelles seront réalisées à partir des échantillons des deux lignées cellulaires décrites ci-dessus incubées avec différentes combinaisons de mycotoxines (tableau 1) seules ou en co-exposition, en ciblant les conditions expérimentales montrant le plus de cytotoxicité. Les concentrations de mycotoxines utilisées dans ces analyses moléculaires seront des doses sublétales. Les protéines intracellulaires totales seront analysées par électrophorèse bidimensionnelle (2D) couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Suite à ces expériences, des biomarqueurs potentiels d'exposition aux mycotoxines, correspondant aux protéines exprimées de manière différentielle, seront identifiés.