

## Étude *in vivo* de l'effet inhibiteur de certains composants alimentaires sur la métabolisation de l'aflatoxine B<sub>1</sub>

par M. Ngombo<sup>1</sup>, B. Rollmann<sup>2</sup>, C. de Meester<sup>1</sup> & A. Léonard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de Mutagenèse et Tératogenèse, Avenue E. Mounier 72, UCL 72.37, B.-1200 Bruxelles, Belgique;

<sup>2</sup>Unité de Chimie Analytique, Avenue E. Mounier 72, UCL 72.30, B.-1200 Bruxelles, Belgique.

Reçu le 7 mars 2000

### RÉSUMÉ

Certaines substances, susceptibles d'interférer sur la métabolisation de l'aflatoxine B<sub>1</sub> ont été étudiées dans ce travail. Elles sont, suivant le cas, naturellement présentes dans les aliments (quercétine, β-naphtoflavone) ou bien elles résultent du mode de préparation de ceux-ci (2-aminodipyrido [1,2-a; 3',2'-d] imidazole, norharmane) ou encore sont employées comme additifs alimentaires (butylhydroxytoluène, BHT).

L'inhibition de l'excrétion urinaire de l'adduit au glutathion est la plus forte pour le Glu-P-2 et le

norharmane. Elle est moyenne pour la quercétine et la β-naphtoflavone. Par contre, le BHT injecté en une seule dose ne présente aucun effet sur la formation de cet adduit.

Ces mêmes substances inhibent aussi la formation des adduits aux protéines, le norharmane étant le plus actif. L'inhibition de la formation d'adduits au glutathion est la plus marquée pour la quercétine et la β-naphtoflavone, faible pour le Glu-P-2 et le norharmane et inexistante pour le BHT.

### SUMMARY *In vivo* study of inhibition by some food components on aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism

Possible interferences with aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism, of some compounds naturally present in food (quercetin, β-naphtoflavon), resulting from way of cooking method (2-aminodipyrido [1,2-a; 1',2'-d] imidazole (Glu-P-2), norharman; NH) or used as food additives (butylated hydroxytoluene; BHT) have been studied *in vivo* by evaluating the production of adducts to glutathione and adducts to serum proteins in laboratory rats.

Glu-P-2 and norharman inhibit strongly the production of adducts to glutathione whereas quercetin and β-naphtoflavon have only a low effect. BHT is completely ineffective. The adducts to proteins are inhibited by the five compounds, the norharman being the most efficient.

### INTRODUCTION

Les aflatoxines (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> et AFG<sub>2</sub>) sont des métabolites sécrétés par divers champignons inférieurs et notamment *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*. Parmi ces aflatoxines, seule l'AFB<sub>1</sub> s'avère une substance hépatotoxique considérée comme hautement cancérigène chez certaines espèces animales. Ces propriétés hépatotoxiques et hépatocancérogènes sont dues à l'AFB<sub>1</sub>-époxyde, métabolite très réactif qui peut former des adduits avec les macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques, l'hémoglobine, glutathion, etc.) (2). Les études épidémiologiques effectuées dans plusieurs pays, notamment en Afrique et en Asie montrent qu'il existe une corrélation positive entre l'ingestion des aflatoxines et le cancer du foie (21).

Dans l'alimentation humaine ou animale, cette aflatoxine se retrouve fréquemment associée à d'autres constituants alimentaires. Dans une étude précédente, nous avons démontré qu'*in vitro* la quercétine, la β-naphtoflavone (des flavones) et le butylhydroxytoluène (un conservateur), qui sont tous les trois des antioxydants, inhibent de façon significative la formation d'AFB<sub>1</sub>-époxyde (réduction d'activité mutagène et diminution d'adduit au glutathion), ce qui n'est pas le cas pour le Glu-P-2 et le norharmane. Ces deux derniers sont des amines hétérocycliques, produits de pyrolyse des aliments contenant les acides aminés et les protéines soumis à de hautes températures.

Pour étudier l'existence éventuelle de tels effets *in vivo*, nous avons évalué la quantité des adduits au glutathion dans l'urine et les adduits aux protéines sériques qui sont considérés comme une voie de détoxification de



l'AFB<sub>1</sub> (1, 7, 8, 9,10, 15). En effet, l'hydrolyse enzymatique ou spontanée du métabolite AFB<sub>1</sub>-époxyde conduit au diol correspondant qui se réarrange en dialdéhyde et celui-ci réagit avec les protéines. Quant à l'AFB<sub>1</sub>-époxyde, il est directement neutralisé par le glutathion (9) (Fig. 1).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour cette étude, nous avons utilisé des rats Wistar mâles, âgés de trois mois et pesant environ 250 g qui ont été traités sur la base des méthodologies décrites dans la littérature.

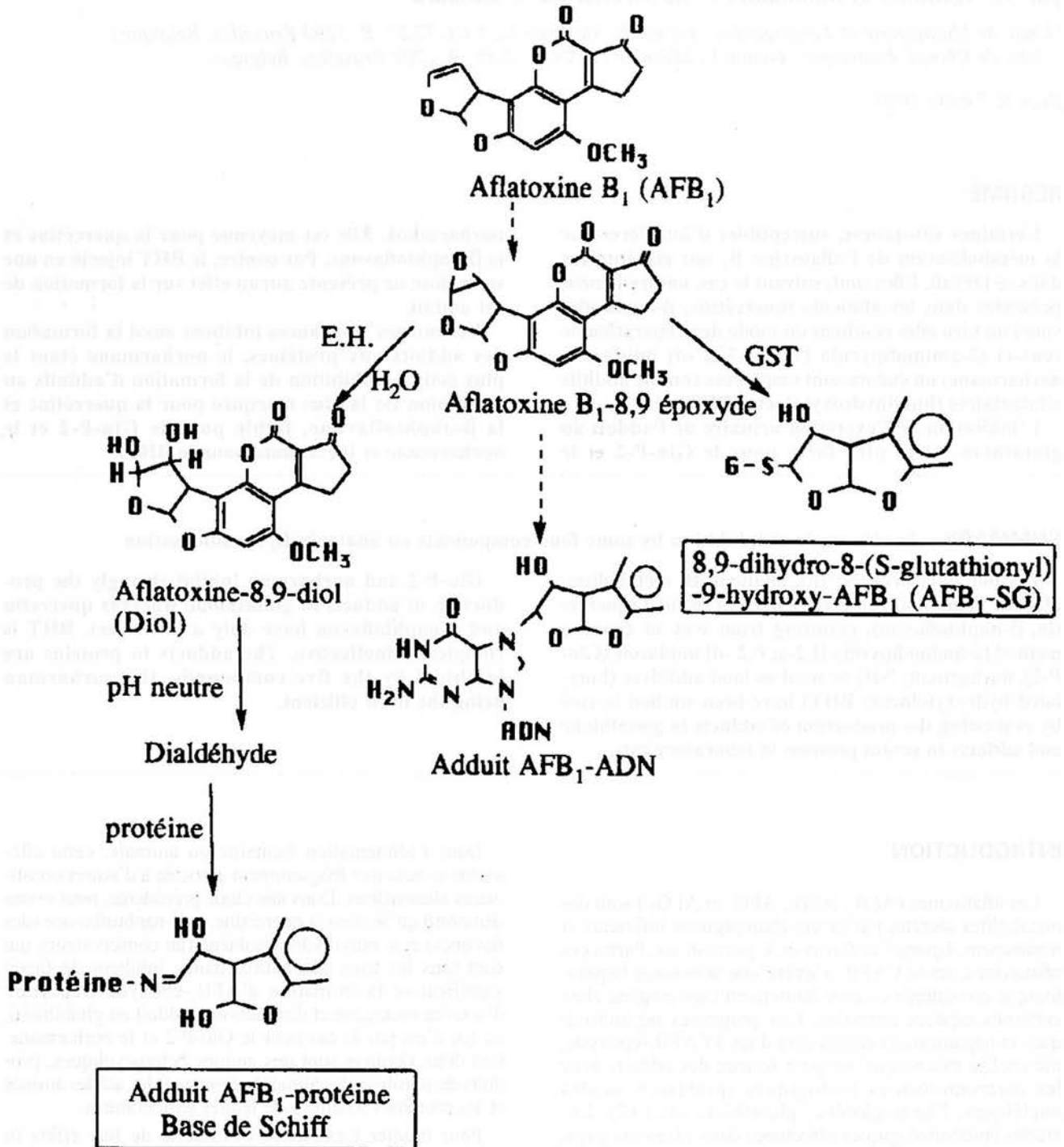


FIG. 1. - Activation métabolique de l'AFB<sub>1</sub> (--->) et les voies de détoxification (→).  
E.H. : époxyde hydrolase ; GST : glutathion-S-transférase (adapté de Groopman & Gain, 1990).

Sur la base des données de cette littérature (17) et d'essais préliminaires avec des doses de 80 à 1280  $\mu\text{g}$  d'aflatoxine B<sub>1</sub> (Sigma), nous avons utilisé comme témoins de référence des rats qui ont reçu la dose de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

C'est cette même dose de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  qui a été administrée 24 h après les divers traitements ci-dessous :

– la quercétine (Janssen chimica) a été dissoute dans du DMSO (40 mg/ml) et administrée par voie i.p. en une dose unique de 80 mg/kg (18);

– la  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF; Aldrich-Europe) dissoute dans du DMSO (10 mg/ml) a été injectée par voie i.p. en une seule dose de 20 mg/kg (16);

– le 2-aminodipyridoimidazole (Glu-P-2; Wako) dissous dans du DMSO (10 mg/ml) a été administré en une seule injection i.p. de 20 mg/kg (3);

– le norharmane (NH; Sigma) a été administré par voie i.p. dans le mélange eau : DMSO (1:9) (10 mg/ml) en une seule injection de 20 mg/kg;

– le butylhydroxytoluène (BHT; Janssen) dissous dans l'huile de maïs (40 mg/ml) a été administré par voie i.p. en une seule injection de 250 mg/kg (12).

Tous les rats ont été sacrifiés 48 h après le traitement par l'AFB<sub>1</sub>.

Les adduits au glutathion ont été dosés selon la méthode de Raj et Lotlikar (17) et Firozi *et al.* (4) après purification sur une microcolonne Sep Pak C<sub>18</sub> (Waters).

Les adduits aux protéines (albumines) ont été évalués par la méthode Elisa après hydrolyse et purification sur une microcolonne Sep Pak C<sub>18</sub> selon Wild *et al.* (22).

## RÉSULTATS

Les résultats présentés dans ce travail expriment, en pourcentages, la quantité réelle d'AFB<sub>1</sub> retrouvée respectivement sous forme d'adduit au glutathion dans les urines totales de 24 h et sous forme d'adduit aux protéines dans le sérum.

L'adduit au glutathion n'a été retrouvé que dans les urines récoltées durant une période de 24 h après le traitement.

Ainsi que le montre la figure 2, il existe une corrélation entre la quantité d'AFB<sub>1</sub> injectée par voie i.p. (80-1280 mg/kg) et l'excrétion urinaire de l'adduit AFB<sub>1</sub>-SG ( $R = 0,972$ ). Pour la dose de 400  $\mu\text{g}$  d'AFB<sub>1</sub> par kg que, sur la base des travaux rapportés dans matériel et méthodes, nous avons finalement retenu pour nos expériences, 1 % environ se retrouve dans l'urine sous forme d'AFB<sub>1</sub>-SG et 4,7 % sous forme d'AFB<sub>1</sub>-protéines dans le sérum.

Le Glu-P-2, le norharmane et la  $\beta$ -NF inhibent fortement la formation des adduits au glutathion respectivement de 84 %, 84 % et 70 %. La quercétine exerce une inhibition moins forte (30 %) tandis que le BHT est sans action sur la formation de ces adduits (Fig. 3).

La formation d'adduits aux protéines est diminuée de 92 % par l'administration simultanée du NH, 76 % par

le  $\beta$ -NF, de 56 % par la quercétine et de 53 % par le BHT (Fig. 4). Le Glu-P-2, qui avait un effet inhibiteur marqué sur les adduits au glutathion, inhibe moins la formation des adduits aux protéines (24 %).

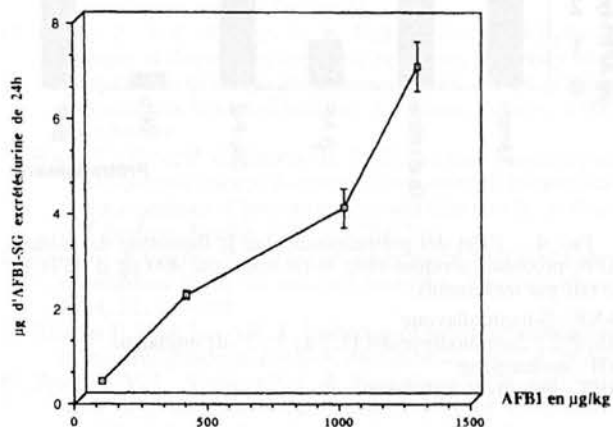


FIG. 2. – Quantité d'AFB<sub>1</sub>-SG excrétée dans l'urine de rats témoins en fonction des doses d'AFB<sub>1</sub> injectées (n = 3) après 24 h.

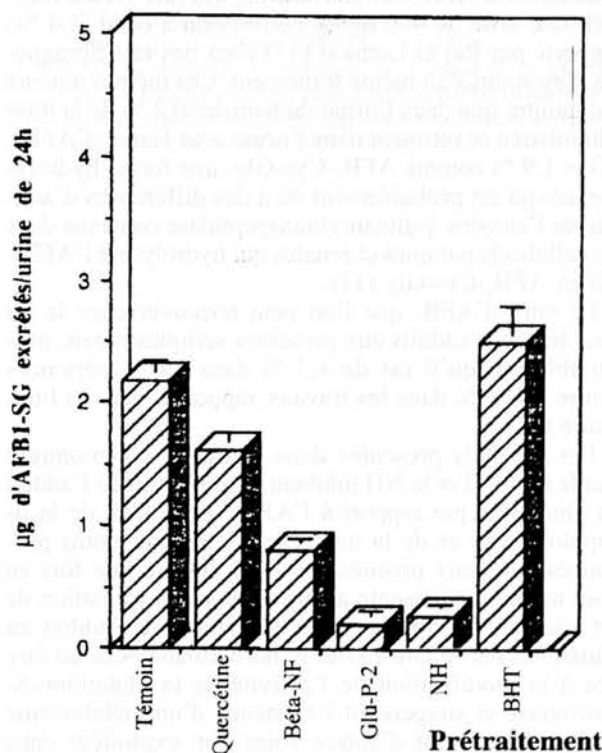


FIG. 3. – Effet des prétraitements sur l'excrétion urinaire d'adduits AFB<sub>1</sub>-SG chez le rat traité par l'AFB<sub>1</sub> à la dose de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (3 rats par traitement) après 24 h.

$\beta$ -NF :  $\beta$ -naphthoflavone

Glu-P-2 : 2-aminodipyridol [1,2-a; 3', 2'-d] imidazole

NH : norharmane

BHT : butylhydroxytoluène.

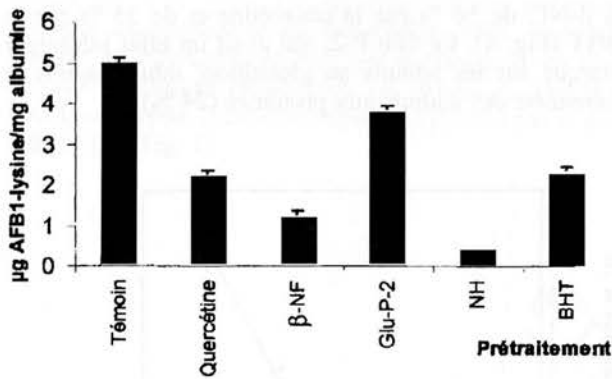


FIG. 4. – Effet des prétraitements sur la formation des adduits AFB<sub>1</sub>-protéines sériques chez le rat traité par 400 µg d'AFB<sub>1</sub>/kg (2 rats par traitement).

β-NF : β-naphtoflavone

Glu-P-2 : 2-aminodipyridol [1,2-a ; 3', 2'-d] imidazole

NH : norharmane

BHT : butylhydroxytoluène.

## DISCUSSION

Le pourcentage (1 %) d'AFB<sub>1</sub> que nous avons retrouvé sous forme d'AFB<sub>1</sub>-SG dans l'urine des rats Wistar recevant une dose de 400 µg/kg correspond à celui (1,4 %) rapporté par Raj et Lotlikar (17) chez des rats Sprague-Dawley soumis au même traitement. Ces mêmes auteurs ont montré que dans l'urine du hamster 0,2 % de la dose administrée se retrouve dans l'urine sous forme d'AFB<sub>1</sub>-SG et 1,9 % comme AFB<sub>1</sub>-Cys-Gly, une forme hydrolysée, ce qui est probablement dû à des différences d'activité de l'enzyme γ-glutamyltranspeptidase contenue dans les cellules hépatiques et rénales qui hydrolysent l'AFB<sub>1</sub>-SG en AFB<sub>1</sub>-Cys-Gly (11).

Le taux d'AFB<sub>1</sub> que l'on peut retrouver chez le rat sous forme d'adduits aux protéines sériques paraît, plus variable puisqu'il est de 4,7 % dans nos expériences contre 1 à 3 % dans les travaux rapportés dans la littérature (22).

Les résultats présentés dans la figure 3 démontrent que le Glu-P-2 et le NH inhibent la formation de l'adduit au glutathion par rapport à l'AFB<sub>1</sub>. Les effets de la β-naphtoflavone et de la quercétine semblent moins prononcés que ceux précités. Le BHT injecté une fois en dose unique ne présente aucun effet sur la formation de cet adduit. L'inhibition de la formation de l'adduit au glutathion par le Glu-P-2 et le norharmane pourrait être liée à la modification de l'activité de la glutathion-S-transférase et suggérerait l'existence d'un métabolisme de l'AFB<sub>1</sub> suivant d'autres voies non exploitées dans notre étude.

En donnant aux rats une nourriture contenant 0,5 % de BHT pendant 10 jours suivie du traitement par l'AFB<sub>1</sub>, Fukuyama et Hsieh (5) rapportent une forte augmentation de l'excrétion urinaire des métabolites hydrosolubles et une diminution des adduits aux acides nucléiques tandis que Goeger *et al.* (6), Sparmins *et al.* (18) ont

observé que le prétraitement des animaux par la β-NF entraîne une augmentation de l'activité de la glutathion-S-transférase et une inhibition des effets cancérigènes.

Dans notre étude, le BHT et la β-NF ont été administrés en une dose unique et n'ont pas donné les résultats identiques à ceux rapportés par les auteurs précités. La quercétine administrée aussi en dose unique n'exerce aucune influence sur la glutathion-S-transférase, donc sur la formation de l'adduit au glutathion.

La figure 4 montre que le norharmane (92 %) et la β-NF (76 %) inhibent fortement la formation de l'adduit aux protéines tandis que la quercétine (56 %) et le BHT (53 %) inhibent environ la moitié de l'adduit aux protéines formé. Toskulkao & Glinsukon (19), Okoye & Neal (14) ont démontré que le prétraitement des rats par l'alcool entraîne une réduction de l'adduit de l'AFB<sub>1</sub> aux protéines sériques (29 %) avec une augmentation simultanée des adduits aux acides nucléiques (125 %) relativement à l'action de l'AFB<sub>1</sub> seule. Nous pouvons dès lors supposer que le norharmane, la β-NF, la quercétine et le BHT ne favorisent pas la formation de l'adduit aux protéines et orienteraient le métabolisme vers d'autres voies.

## CONCLUSIONS

Les flavones (quercétine et β-naphtoflavone) utilisées en une dose unique ne favorisent pas la formation des adduits au glutathion et aux protéines qui sont la voie de détoxification. Le BHT inhibe la formation des adduits aux protéines mais, il augmente légèrement la formation des adduits au glutathion.

Quant au Glu-P-2 et le norharmane, ils inhibent de façon significative la formation des adduits au glutathion, mais leur action est différente sur les adduits aux protéines : le norharmane présente un pouvoir inhibiteur très fort alors que le Glu-P-2 exerce une faible inhibition.

Les résultats obtenus *in vitro* ne ressemblent pas à ceux obtenus *in vivo* probablement à cause de différents mécanismes impliqués dans ces deux milieux.

**Remerciements.** – Nous remercions Dr C. P. WILD et B. CHAPOT de l'Unité de cancérogenèse de l'I. A. R. C. à Lyon pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans la quantification des adduits AFB<sub>1</sub>-protéines sériques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Degen G. H. & Neumann H. G., Differences in aflatoxin B<sub>1</sub>-susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability *in vitro* to inactivate AFB<sub>1</sub>-epoxide. *Carcinogenesis*, 1981, 2, 299-306.
2. de Olivera C. A. & Germano P. M., Aflatoxins: current concepts on mechanisms of toxicity and their involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. *Revista-De Saude-Publica*, 1997, 31 (4), 417-424.
3. de Meester C., Glorieux E. & Saint-Ruf., Effect of dipyridimidazole pretreatment on mutagen activation in rats. *Mutation Res.*, 1988, 203, 95-101.

4. Firozi P. F., Aboobaker V. H. & Bhattacharya R. K., Modifying by certain factors metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub> as detected *in vitro* in a simple fluorimetric assay. *Chem. Biol. Interactions*, 1986, 58, 173-184.
5. Fukayama M. Y. & Hsieh D. P. H., Effect of butylated hydroxytoluene pretreatment on excretion, tissue distribution and DNA binding of <sup>14</sup>C. aflatoxin B<sub>1</sub> in the rat. *Fd Chem. Toxicol.*, 1985, 23, 567-573.
6. Goeger D. E., Hendricks D. W., Pereira C. & Bailey G., Comparative effect of dietary butylated hydroxyanisole and β-naphthoflavone on aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism, DNA adduct formation and cancerogenesis in rainbow trout. *Carcinogenesis*, 1988, 9, 1793-1800.
7. Gopaldaswamy U. V., Frei E., Frank N., Kliem H. C., Wiessler M., Bertram B. & Bhattacharya R. K., Chemopreventive effects of dithiocarbamates on aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism and formation of AFB<sub>1</sub> adducts with glutathione. *Anticancer Res.*, 1998, 18 (3A), 1827-1832.
8. Groopman J. D. & Gain L. G. Interactions of fungal and plant toxins with DNA. In: chemical carcinogenesis and mutagenesis I. Springer-Verlag (Ed.) *Handbook of experimental pharmacology*, 1990, Vol. 94/1, Berlin Heidelberg, 373-403.
9. Guengerich F. P., Johnson W. W., Shimada T., Ueng Y. F., Yamazaki H. & Langouet S., Activation and detoxication of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Mutation Res.*, 1998, 402 (1-2), 121-128.
10. Hayes J. D., Pulford D. J., Ellis E. M., McLeod R., James R. F., Seidegard J., Mosialo E., Jernstrom B. & Neal G. E., Regulation of rat glutathione S-transferase A<sub>3</sub> by cancer chemopreventive agents: mechanisms of inducible resistance to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Chem.-Biol. Interact.*, 1998, 111-112, 51-67.
11. Moss E. J., Manson M. M. & Neal G. E., Effects of manipulation of gamma-glutamyltranspeptidase levels on biliary excretion of AFB<sub>1</sub> conjugates. *Carcinogenesis*, 1984, 5, 869-874.
12. Nakagawa Y., Tayama K. & Hiraga K., Hepatic toxicity of butylated hydroxytoluene to rats. *Toxicologist*, 1986, 6, 184 (abstract).
13. Neal G. E. & Colley P. J. The formation of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxyafatoxin B<sub>1</sub> by the metabolism of AFB<sub>1</sub> *in vitro* by rat liver microsomes. *FEBS Letters*, 1979, 101, 382-386.
14. Ngombo M., Rollman B., de Meester C. & Léonard A., Étude *in vitro* de l'interférence de certains constituants alimentaires avec la métabolisation de l'aflatoxine B<sub>1</sub> (soumis pour la publication dans *J. Soc. Biol.*).
15. Okoye Z. S. C. & Neal G. E. Enhanced ethanol-induced changes in disposition and toxic responses to dietary aflatoxin B<sub>1</sub>, due to sacoglottis gabonensis bark extract, a Nigerian alcoholic beverage additive. *Fd. Chem. Toxicol.*, 1988, 26, 679-689.
16. Raina V., Koser P. & Guurtoo H. L., Differential sensitivity of Ah-responsive mice to β-naphthoflavone-induced metabolism and mutagenesis of benzo(a)pyrene and aflatoxin B<sub>1</sub>. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1985, 16, 255-261.
17. Raj H. J. & Lotlikar P. D. Urinary excretion of thiol conjugates of aflatoxin B<sub>1</sub> in the rats and hamsters. *Cancer Letters*, 1984, 22, 125-133.
18. Rastogi P. B. & Levin R. E. Induction of sperm abnormalities in mice by quercetin. *Environ. Mutagenesis*, 1987, 9, 79-86.
19. Sparnins V. L., Venigas P. L. & Wattenberg L. W. Enhancement of glutathione-S-transferase activity by compounds inhibiting chemical carcinogenesis and by dietary constituents. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1982, 68, 493-496.
20. Toskulka C. & Glinsukon T., Effect of ethanol on the *in vivo* covalent and *in vitro* metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> in rats. *Toxicology letters*, 1986, 30, 151-157.
21. Van Rensburg S. J., Cook-Mozaffari P., Van Schalkwyk D. J., Van der Watt J. J., Vincent T. J. & Purchase I. F. Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br. J. Cancer*, 1985, 51, 713-726.
22. Wild C. P., Jiang Y.-Z., Sabbioni G., Chapot B. & Montesano R., Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Res.*, 1990, 50, 245-251.

