

La nidulotoxine: toxine d'*Aspergillus nidulans* Wint

Au cours d'une étude¹ de la toxinogénèse d'*Aspergillus* appartenant à différentes espèces ou groupes taxonomiques, nous avons noté qu'un fort pourcentage de souches d'*A. nidulans* Wint élaborait in vitro un principe toxique pour le caneton. Ces résultats confirmaient d'ailleurs les observations de SCOTT². Nous avons ultérieurement montré que des extraits de cultures de ce champignon inhibent le développement de l'embryon de poulet³. Il nous a paru intéressant d'isoler et de purifier la substance responsable de ces phénomènes toxiques pour plusieurs raisons: d'une part sur les chromatogrammes d'extraits toxiques de cultures d'*A. nidulans* on ne peut mettre en évidence aucun spot correspondant à une mycotoxine déjà connue; d'autre part la toxine élaborée par *A. nidulans* peut être présente assez fréquemment dans des produits céréaliers ou des aliments du bétail, le champignon étant un constituant courant de la mycoflore de ces produits (LAFONT et LAFONT⁴).

L'expérimentation a été effectuée en utilisant *A. nidulans* Wint, souche 516 B de notre collection. Cette souche a été isolée d'un échantillon d'aliment composé destiné aux volailles.

Le milieu de culture utilisé est le milieu synthétique de CZAPEK, modifié selon BRIAN et al.⁵. Ce milieu liquide auquel on ajoute de l'asparagine (2⁰/₀₀) est réparti à raison de 85 ml dans des flacons de 8 cm de diamètre contenant une couche de coton cardé (2 g) surmontée d'une couche de coton hydrophile (2 g). Le coton cardé employé est totalement exempt de fragment d'enveloppes des graines. Après répartition le milieu est autoclavé à 114°C/45 min. Chaque flacon reçoit un inoculum contenant approximativement 20 × 10⁶ spores; cet inoculum provient d'une culture âgée de 8 jours sur milieu gélosé. L'incubation des cultures est conduite à 30°C pendant 8 jours.

Les cultures et le milieu sous-jacent sont soumis à 3 extractions successives, d'une durée d'une heure chacune, par le chloroforme bouillant, ces extractions étant effectuées dans les fioles de cultures.

L'extrait chloroformique est évaporé à sec sous vide; le résidu est repris par du méthanol aqueux (20% d'eau); cette solution méthanolique subit une partition contre de l'hexane, puis est évaporé sous vide. Ce résidu est solubilisé dans le chloroforme. 3 chromatographies successives (en éther sulfurique, en chloroforme/éther (6/4, v/v), en éther sulfurique) sur couches minces (épaisseur 0,25 mm) de silica-gel G Merck permettent de purifier la nidulotoxine. Après chaque chromatographie l'élution des substances adsorbées sur la silice est faite par le mélange azéotrope chloroforme-acétone-méthanol (470/300/230, v/v) en appareil de Soxhlet pendant 5 h. Le repérage du spot de nidulotoxine est facilité par le développement d'une fluorescence rouge sous irradiation UV (Lampe Philips HP125 ou Hanovia).

La cristallisation de la nidulotoxine est obtenue par refroidissement d'une solution acétonique.

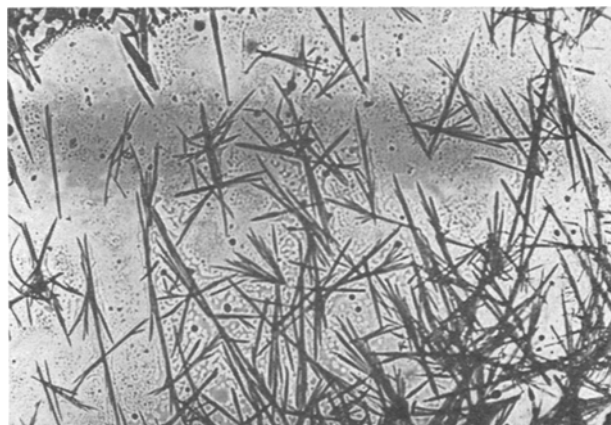
La toxicité de la nidulotoxine a été étudiée pour l'embryon de poulet et le caneton. Les œufs fécondés de poule, de races M41, Leghorn et Hubbard, sont inoculés avant toute incubation par la voie de la chambre à air. Le produit solubilisé dans le propylène-glycol ou l'éthanol aqueux (50/50, v/v) est inoculé sous volume de 0,02 ml par œuf dans le premier cas, sous volume de 0,01 ml dans le second. Des canetons âgés d'un jour reçoivent par voie i.p. une solution de 0,15 ml par animal en propylène-glycol.

Sur les chromatogrammes la nidulotoxine présente une légère coloration jaune en lumière du jour et une intense fluorescence rouge-brique sous irradiation ultra-violette.

Après élution, la solution acétonique concentrée laisse déposer au froid des cristaux incolores en aiguilles. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau distillée, l'hexane, peu solubles dans le benzène, solubles dans l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'éther sulfurique, le chloroforme, le tétrachlorure de carbone. Leur point de fusion est de 240,5°C. L'extrait d'un litre de culture permet d'obtenir environ 25 mg de cristaux.

Le chlorure ferrique en milieu alcoolique donne une réaction colorée, verte, avec la nidulotoxine. Celle-ci ne se colore pas sous l'action de l'hyposulfite en solution 10 N d'hydroxyde de sodium.

La DL₅₀ de cette mycotoxine pour l'embryon de poulet est de 1 µg/œuf. La toxicité se manifeste par l'arrêt du développement de l'embryon; cet arrêt a généralement lieu pendant la première semaine d'incubation, exceptionnellement plus tardivement. A en juger par les observations faites sur plusieurs centaines d'embryons recevant la nidulotoxine à dose légèrement inférieure à la DL₅₀, la mycotoxine ne semble pas être tératogène.



Cristaux de nidulotoxine. × 40.

Caractéristiques chromatographiques de la nidulotoxine sur couche mince de silica-gel Merck

Rf de la nidulotoxine dans différentes phases chromatographiques	Rf
Phases	
Ether sulfurique	0,50
Chloroforme-éther (6/4, v/v)	0,62
Benzène-acétone (8/2, v/v)	0,69
Chloroforme-méthanol (95/5, v/v)	0,78

¹ C. FRAYSSINET et P. LAFONT, *Annls. Inst. Pasteur, Paris* 116, 331 (1969).

² B. DE SCOTT, *Mycopathol. Mycol. appl.* 25, 213 (1965).

³ J. LAFONT, C. FRAYSSINET et P. LAFONT, *C. r. Soc. Biol.*, sous presse.

⁴ P. LAFONT et J. LAFONT, *Annls. Inst. Pasteur, Paris* 116, 237 (1969).

⁵ P. W. BRIAN, A. W. DAWKINS, J. F. GROVE, H. G. HEMMING, D. LOWE et G. L. NORRIS, *J. exp. Bot.* 12, 1 (1961).

La DL_{50} pour le caneton âgé d'un jour n'a pas été déterminée. L'inoculation à cet animal de doses variant de 100 à 250 μ g a un effet léthal en moins de 7 jours. A l'autopsie on ne relève aucune lésion caractéristique; l'examen histopathologique du tissu hépatique montre des altérations correspondant à une stéatose de type banal.

Plusieurs essais ont montré que la production in vitro de nidulotoxine était obtenue en utilisant des substrats différents du milieu synthétique de Czapek, modifié selon BRIAN et al.⁵ et additionné d'asparagine. La présence de coton dans le milieu liquide a pour seul effet de favoriser un développement rapide et abondant du mycélium, à la surface du milieu.

La nidulotoxine est le principal, sinon l'unique, métabolite toxique contenu dans les extraits de cultures d'*A. nidulans*; en effet l'administration au caneton et l'inoculation dans l'œuf fécondé des différentes fractions chromatographiques obtenues à partir de ces extraits et ne contenant pas de nidulotoxine n'ont pas permis d'observer de phénomènes toxiques nets.

MOREAU⁶ a émis l'hypothèse que la toxicité des produits végétaux sur lesquels s'est développé *A. nidulans* pouvait être reliée à la synthèse, par le champignon, d'acide kojique ou d'un pigment anthraquinonique, l'asperthécine, étudié par HOWARD et RAISTRICK⁷ et NEELAKANTAN, POCKER et RAISTRICK⁸. Différents caractères propres à la nidulotoxine permettent d'affirmer que cette substance est différente de l'acide kojique et de l'asperthécine. La

nidulotoxine ne peut d'autre part être confondue avec la niduline et la norriduline^{9,10} depsidones élaborées par certains *A. nidulans* et douées d'activité antibiotique^{11,12}.

Zusammenfassung. Isolierung, Charakterisierung, Reinigung und toxische Wirkung eines Toxins aus *Aspergillus nidulans* Wint.

P. LAFONT, J. LAFONT
et C. FRAYSSINET

*Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer,
F-94 Villejuif et*

*I.N.S.E.R.M., Laboratoire de Toxicologie Alimentaire,
B. postale 40, F-78 Le Vésinet (France), 8 août 1969.*

⁶ C. MOREAU, *Moisissures toxiques dans l'alimentation* (Ed. P. CHEVALIER; Paris 1968).

⁷ B. H. HOWARD et H. RAISTRICK, *Biochem. J.* 59, 475 (1955).

⁸ S. NEELAKANTAN, A. POCKER et H. RAISTRICK, *Biochem. J.* 64, 234 (1957).

⁹ F. M. DEAN, J. C. ROBERTS et A. ROBERTSON, *J. chem. Soc.* (1954), 1432.

¹⁰ F. M. DEAN, A. D. ERNI et A. ROBERTSON, *J. chem. Soc.* (1956), 3545.

¹¹ Ce travail a bénéficié d'une aide financière de contrats de recherches de l'Action Concertée «Nutrition».

¹² Les auteurs expriment leur gratitude à Messieurs M. GAILLARDIN et R. GUERRY pour leur assistance technique.

Noradrenalin-Freisetzung aus dem Hypothalamus in vitro

Die Abgabe von Noradrenalin aus subzellulären, aminspeichernden Partikeln des Hypothalamus wird sowohl durch Kalzium als auch durch Acetylcholin stark erhöht¹. Versuche an Nebennieren zeigten, dass Kalzium-Ionen und Acetylcholin die Adrenalin-Freisetzung aus den intakten Nebennierenmarkzellen vermehren, während die Amin-Abgabe aus den subzellulären Vesikeln durch Kalzium, nicht aber durch Acetylcholin erhöht werden kann²⁻⁴. Es wird postuliert, dass sowohl Kalzium als auch Acetylcholin für die physiologische Sekretion des Hormons von Bedeutung sind. Um festzustellen, ob durch die beiden Stoffe auch aus den intakten Zellen des Zentralnervensystems die Amin-Abgabe gesteigert wird, wurden Hypothalami präpariert und in vitro mit Kalzium und Carbachol inkubiert. Anstatt Acetylcholin wurde Carbachol verwendet, da es durch die Cholinesterase kaum abgebaut wird.

Methoden. Ratten wurden bei 0°C dekapitiert, die Gehirne sofort entnommen und die Hypothalami präpariert. Jeder Ansatz enthielt 10 Hypothalami und 10 ml Ringer-Lösung. Kalzium und Carbachol wurden in Ringer-Lösung gelöst. Die Ansätze wurden 20 min lang bei 37°C unter Schütteln (Frequenz: 100/min) inkubiert und während der Inkubation mit Karbogensgas durchperlt. Die nicht inkubierten Kontrollen wurden sofort, die Inkubationsansätze nach der Inkubation 30 min lang mit 2000 g bei 0°C zentrifugiert, die Rückstände mit 8 ml 0,4 N HClO₄ extrahiert und nach erneutem Zentrifugieren im Überstand die Amine⁵, im Rückstand das Eiweiss⁶ bestimmt. In einigen Versuchen wurden die Hypothalami in EDTA-haltiger Ringer-Lösung (10⁻³ M) suspendiert; nach 10 min langem Stehen bei 0°C wurden die Ansätze zentrifugiert, die Hypothalami mit EDTA-freier Ringer-Lösung versetzt und anschliessend inkubiert. Der Noradrenalin-Gehalt der Ansätze wurde pro Miligramm Ei-

weiss berechnet. Als Ausgangswert für die Berechnung der prozentualen Noradrenalin-Freisetzung diente der Noradrenalin-Gehalt pro Miligramm Eiweiss der Kontrollansätze (0°C, 0 min). Jeder Wert eines Versuches entspricht dem Mittelwert drei gleichartiger Ansätze.

Versuche. Um festzustellen, ob Kalzium-Ionen die Abgabe von Noradrenalin aus den Hypothalami beeinflussen, wurden sie in kalziumfreier und kalziumhaltiger Ringer-Lösung 20 min lang bei 37°C inkubiert. Die spontane Noradrenalin-Freisetzung aus den intakten Hypothalami in Abwesenheit von Kalzium-Ionen ist sehr gering; sie beträgt 5,4% (Figur). Wird jedoch der Ringer-Lösung Kalzium als Chlorid zugegeben (5 × 10⁻³ M), so wird die Abgabe des Amins stark erhöht (17,9%). Somit verursacht die verwendete Kalzium-Konzentration eine mehr als 200prozentige Steigerung der spontanen Noradrenalin-Abgabe.

Um die Wirkung des Carbachols auf die Amin-Freisetzung zu untersuchen, wurden die Hypothalami in kalziumhaltiger Ringer-Lösung inkubiert. Die hohe Noradrenalin-Freisetzung der Kontrollansätze ist auf die Gegenwart von Kalzium-Ionen zurückzuführen. Carbachol (1,4 × 10⁻⁴ M) vermag die Amin-Abgabe statistisch signifikant (um 53,9%) zu steigern.

¹ A. PHILIPP und H. PRZUNTER, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 258, 238 (1967).

² W. W. DOUGLAS und R. P. RUBIN, *J. Physiol.* 159, 40 (1961).

³ H. BLASCHKO, P. HAGEN und A. D. WELCH, *J. Physiol.* 129, 27 (1955).

⁴ A. PHILIPP und H. J. SCHÜMANN, *Experientia* 18, 138 (1962).

⁵ J. F. PALMER, *J. Pharm. Pharmacol.* 15, 777 (1963).

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).