

L'OCHRATOXINE A : NATURE, ORIGINE ET TOXICITE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Marion ROUVIER

Née, le 11 décembre 1977 à LE MANS (Sarthe)

Directeur de thèse : M. le Docteur Philippe GUERRE

JURY

PRESIDENT :
M. Gérard CAMPISTRON

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Philippe GUERRE
M. Jean-Denis BAILLY

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Gérard CAMPISTRON

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de notre Jury de Thèse

Sincères remerciements

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Docteur Philippe GUERRE

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pharmacie et Toxicologie

Pour nous avoir proposé le sujet de ce travail

Qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance

Monsieur le Docteur Jean-Denis BAILLY
Maître de Conférences de l'Ecole Nationale vétérinaire de Toulouse
Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale
Qui a bien voulu faire partie de notre jury de thèse
Hommages respectueux

A tous ceux que j'aime et qui m'ont aidée à réaliser ce rêve

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	17
-----------------------------	----

PARTIE 1. OCHRATOXINE A : NATURE, PROPRIETES ET ORIGINE

1- <u>OCHRATOXINE A ET DERIVES</u>	23
1-1- <u>Structure</u>	23
1.1.1. ochratoxine A.....	23
1.1.2. dérivés.....	24
1-2- <u>Propriétés physiques et chimiques de l'OTA</u>	25
1-3- <u>Techniques d'analyse</u>	26
2- <u>LES MOISSURES</u>	30
2-1- <u>Généralités</u>	30
2-2- <u>Les moisissures</u> :.....	33
2.2.1. <i>Aspergillus</i>	33
2.2.2. <i>Penicillium</i>	36
2-3- <u>Toxinogénèse</u>	37
2.3.1. Voies de synthèse.....	37
2.3.2. facteurs déterminants.....	40
2.3.3. facteurs favorisants.....	42
3- <u>CONTAMINATION DES ALIMENTS</u>	44
3-1- <u>Répartition et niveaux de contamination</u>	44
	47

3-2- <u>Moyens de lutte</u>	
-----------------------------------	--

PARTIE 2. LES OCHRATOXICOSES

1- <u>L'ESPECE PORCINE</u>	55
1-1- <u>Présentation</u>	55
1-2- <u>Symptômes</u>	55
1.2.1. Forme chronique.....	56
1.2.2. Forme aiguë.....	56
1-3- <u>Diagnostic</u>	58
1.3.1. Clinique.....	58
1.3.2. Biologique.....	58
1.3.3. Lésionnel.....	59
1.3.4. Expérimental.....	60
1-4- <u>Pronostic</u>	62
1-5- <u>Traitement et prophylaxie</u>	62
2- <u>LES VOLAILLES</u>	64
2-1- <u>Présentation</u>	64
2-2- <u>Symptômes</u>	64
2.2.1. Forme chronique.....	64
2.2.2. Forme aiguë.....	66
2.2.3. Effet de l'OTA sur la fertilité et la viabilité embryonnaire.....	66
2.2.4. Particularités symptomatiques.....	66
2-3- <u>Diagnostic</u>	68
2.3.1. Clinique.....	68
2.3.2. Biochimique.....	68
2.3.3. Hématologique.....	69
2.3.4. Lésionnel.....	70
2.3.5. Expérimental.....	72
2-4- <u>Traitement et prophylaxie</u>	73
3- <u>LES RUMINANTS</u>	75
4- <u>LE CHIEN</u>	75
5- <u>L'HOMME</u>	76
	76
	78

5-1-	<u>Présentation</u>	
5-2-	<u>Symptômes et lésions</u>	

PARTIE 3. CINETIQUE ET ETUDE EXPERIMENTALE

1-	<u>TOXICOCINETIQUE</u>	85
1-1-	<u>Absorption</u>	85
1-2-	<u>Distribution plasmatique et tissulaire</u>	86
1.2.1.	Fixation aux protéines plasmatiques.....	86
1.2.2.	Distribution dans les tissus.....	87
1.2.3.	Demi-vie plasmatique.....	89
1-3-	<u>Métabolisme</u>	89
1-4-	<u>Élimination par excrétion</u>	91
2-	<u>TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE</u>	93
2-1-	<u>Toxicité aiguë</u>	93
2-2-	<u>Toxicité subaiguë et chronique</u>	95
2-3-	<u>Embryotoxicité et tératogénicité</u>	96
2-4-	<u>Carcinogénicité</u>	97
2-5-	<u>Toxicité spécifique d'organes</u>	98
2.5.1.	Néphrotoxicité.....	98
2.5.2.	Hépatotoxicité.....	99
2.5.3.	Immunotoxicité.....	99
3-	<u>BASES MOLECULAIRES DE LA TOXICITE</u>	100
3-1-	<u>Effets sur l'ADN</u>	100
3.1.1.	Mutagénicité et adduit.....	100
3.1.2.	Synthèses d'ADN non programmées.....	102
3.1.3.	Cassures des ADN simple brin.....	103
3.1.4.	Aberrations chromosomiques.....	103
3.1.5.	Echanges de chromatides sœurs.....	103
3.1.6.	Formation de micronoyaux.....	103
3.1.7.	Caryomégalies.....	104
3-2-	<u>Effets au niveau de la transcription et de la traduction</u>	105
3.3.1.	Description.....	105
3.3.2.	Conséquences sur le métabolisme des glucides.....	106

3-3- **Effets sur le métabolisme des lipides**.....

3-4- **Effets sur la respiration mitochondriale**.....

PARTIE 4. EVALUATION DU RISQUE

1- <u>POUR L'ANIMAL</u>	111
1-1- <u>Exposition</u>	111
1-2- <u>Cas du porc</u>	112
1.2.1. Manifestations cliniques.....	112
1.2.2. Impact zootechnique.....	112
1.2.3. Persistance de résidus.....	113
1-3- <u>Cas des Volailles</u>	114
1.3.1. Manifestations cliniques.....	114
1.3.2. Impact zootechnique.....	114
1.3.3. Persistance de résidus.....	115
<u>1-4- Cas des Ruminants</u>	115
2- <u>RISQUES POUR L'HOMME</u>	116
2-1- <u>Estimation de la DJA</u>	116
2-2- <u>Exposition alimentaire</u>	117
2.2.1. Céréales et dérivés.....	117
2.2.2. Problème des résidus.....	118
2.2.3. Contribution relative des produits céréaliers et des denrées d'origine animale.....	120
2-3- <u>Vérification de l'exposition</u>	121
2-4- <u>Règlementation</u>	123
CONCLUSION GENERALE.....	125
BIBLIOGRAPHIE.....	129

Liste des abréviations

OTA : ochratoxine A

OTB : ochratoxine B

OTC : ochratoxine C

OTá : ochratoxine á

OTâ : ochratoxine â

CCM : chromatographie sur couche mince

CLHP : chromatographie liquide haute performance

PV : poids vif

PC : poids corporel

NEB : Néphropathie endémique des Balkans

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableaux :

Tableau 1 : Limites de détection et de quantification des méthodes chromatographiques utilisées pour l'OTA dans les fluides humains et animaux.....	28
Tableau 2 : Limites de détection et de quantification des méthodes chromatographiques utilisées pour l'OTA dans les tissus humains et animaux.....	29
Tableau 3 : Les différentes espèces d' <i>Aspergillus</i> et de <i>Penicillium</i> productrices d'OTA.....	30
Tableau 4 : Souches de moisissures productrices d'OTA qui synthétisent, par ailleurs, d'autres toxines néphrotoxiques ou cohabitent avec des moisissures productrices de mycotoxines majeures	31
Tableau 5 : Exemples de produits contaminés par <i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Penicillium viridicatum</i>	32
Tableau 6 : Croissance des moisissures et humidité.....	40
Tableau 7 : Conditions minimales et optimales de production d'OTA par <i>P.viridicatum</i> sur le blé et sur l'orge.....	40
Tableau 8 : Conditions de stockage favorisant l'ochratoxinogénèse.....	43
Tableau 9 (a, b, c, d) : Niveaux de contamination en OTA.....	45
Tableau 10 : Domaine d'application des méthodes chimiques de destruction et de décontamination de l'ochratoxine dans les rejets de laboratoires.....	50
Tableau 11 : Effets de l'ochratoxine A en association avec d'autres mycotoxines.....	58
Tableau 12 : Résidus dans les tissus de porc après une exposition orale à l'OTA.....	61
Tableau 13 : Récapitulatif des manifestations d'une ochratoxicose chez les porcs.....	63
Tableau 14 : Résidus dans les tissus de volailles après une exposition orale à l'OTA.....	73
Tableau 15 : Récapitulatif des manifestations d'une ochratoxicose chez les volailles.....	74
Tableau 16 : Similitudes entre la néphropathie porcine induite par l'OTA et la néphropathie endémique des Balkans.....	76
Tableau 17 : concentration en OTA dans des échantillons de plasma humain collectés sur une période d'un an.....	78
Tableau 18 : concentration en OTA dans des échantillons de plasma humain collectés dans 5 ville Croates.....	78
Tableau 19 : Effets de l'OTA à faible dose et à forte dose sur les cellules du tubule proximal et celles du canal collecteur.....	80
Tableau 20 : Récapitulatif des manifestations de la Néphropathie Endémique des Balkans....	80
Tableau 21 : Constantes d'association entre l'OTA et les albumines sériques.....	86
Tableau 22 : Demi-vie plasmatique de l'OTA après une administration orale.....	89
Tableau 23 : Clairance corporelle totale via la bile, l'urine et la métabolisation.....	91
Tableau 24 : DL 50 pour l'OTA chez différentes espèces animales.....	94
Tableau 25 : Toxicité subaigüe et chronique de l'OTA.....	96
	97

Tableau 26 : Résumé des informations concernant la carcinogénicité de l'OTA chez l'animal	
Tableau 27 : récapitulatif des éléments en faveur en défaveur des effets génotoxiques et mutagènes de l'OTA.....	
Tableau 28 : Teneur en OTA dans des céréales destinées à l'alimentation des animaux en France.....	
Tableau 29 : Nature du risque lié à l'ingestion d'aliments contaminés par de l'OTA chez le porc.....	
Tableau 30 : : Nature du risque lié à l'ingestion d'aliments contaminés par de l'OTA chez les volailles.....	115
Tableau 31 : Teneur en OTA dans différents produits céréaliers destinés à l'alimentation humaine en France.....	118
Tableau 32 : Teneur en OTA dans des denrées d'origine animale.....	119
Tableau 33 : Présence d'OTA dans du lait de vaches.....	119
Tableau 34 : Ingestion d'OTA sur la base de données européennes.....	120
Tableau 35 : Apport en OTA par les céréales dans différentes régions du monde.....	121
Tableau 36 : Fréquence de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France.....	122
Tableau 37 : réglementation pour l'OTA par pays et par produits.....	123

Figures :

Figure 1 : Structure générale des ochratoxines.....	24
Figure 2 : <i>Aspergillus ochraceus</i>	33
Figure 3 : Schéma de synthèse de l'OTA.....	39

Photographies :

Photographie 1 : Cohabitation d' <i>Aspergillus</i> sp. et <i>Penicillium</i> sp.	31
Photographie 2 : Tête aspergillaire en microscopie électronique.....	33
Photographie 3 : <i>Aspergillus ochraceus</i> en culture.....	34
Photographie 4 : <i>Aspergillus ochraceus</i> à la loupe binoculaire.....	34
Photographie 5 : Têtes aspergillaires en microscopie optique.....	34
Photographie 6 : Mâ s contaminé par des moisissures du genre <i>Aspergillus</i>	35
Photographie 7 : Grappe de raisins contaminés par des moisissures du genre <i>Aspergillus</i>	35
Photographie 8 : <i>Penicillium viridicatum</i> en culture.....	37
Photographie 9 : <i>Penicillium viridicatum</i> à la loupe binoculaire.....	37
Photographie 10 : <i>Penicillium viridicatum</i> en microscopie optique.....	37
Photographie 11 : Foie de poulet fibrosé avec des foyers de nécrose.....	71
Photographie 12 : Reins de poulet hypertrophiés.....	71

INTRODUCTION

L'ingestion d'aliments contaminés par des toxines synthétisées par des moisissures entraîne des expressions cliniques variées connues sous le terme de "mycotoxicoses".

Parmi les effets observés, une atteinte rénale peut être causée par plusieurs mycotoxines (OTA, citrinine, fumonisines) mais c'est la néphrotoxicité de l'ochratoxine A qui a été la plus étudiée. Dès 1928, un pathologiste du nom de Larsen qui travaillait dans un abattoir Danois observa de nombreux cas de lésions rénales chez le porc. Il put reproduire expérimentalement ces lésions en nourrissant des porcs avec des céréales moisies. Cette description de la néphropathie porcine fut le premier cas bien documenté de mycotoxicose depuis la découverte de l'ergotisme au 18^{ème} siècle. Depuis l'agent étiologique a été identifié comme étant l'OTA. L'ochratoxicose entraîne des affections variées dominées par un syndrome de néphropathie aiguë ou chronique chez les animaux. L'espèce animale la plus sensible à l'OTA semble être le porc mais la mycotoxine est dangereuse pour nombre d'autres espèces.

Chez l'homme, l'OTA a été incriminée dans l'étiologie d'une maladie rénale chronique : la Néphropathie Endémique des Balkans dès 1972. Les similitudes des caractéristiques cliniques et histologiques entre cette maladie et la néphropathie induite chez l'animal par l'ingestion d'ochratoxine A sont à l'origine de cette association, toutefois aucune relation de cause à effet n'est à ce jour établie.

L'importance de ces affections est d'autant plus forte que la contamination des aliments est très large. En effet, cette mycotoxine est produite par des moisissures de stockage des genres *Penicillium* sous les climats tempérés et *Aspergillus* dans les pays chauds et les zones tropicales, parmi les *Aspergillus*, *Aspergillus ochraceus* est la plus souvent à l'origine de la production. Ces moisissures sont ubiquistes et contaminent de nombreux aliments destinés à l'alimentation humaine et animale. Ainsi, les récoltes de maïs, blé, orge, riz, avoine, seigle, haricots, soja, pois ou cacahuètes peuvent être contaminées, on peut également trouver de l'OTA dans le café et le cacao, ainsi que dans les fruits secs. L'OTA étant thermostable, tous les dérivés de ces produits : pain, pâtes mais aussi vin et jus de raisin, peuvent en contenir. Enfin, la viande de certains animaux ayant consommé ces céréales peut, elle aussi, être contaminée par l'OTA.

Pourquoi et comment retrouve-t-on de l'OTA dans de nombreuses denrées destinées à la consommation humaine et animale ? Quelles sont les cibles de cette mycotoxine chez l'homme et chez les animaux ? Quelle est la nature du danger lié à l'ingestion de cette mycotoxine en France ? sont autant de questions qui peuvent être posées au vétérinaire praticien, mais également au vétérinaire sanitaire dans le cadre du contrôle de la qualité des productions animales et qui sont suscitées par la fréquence de la contamination des aliments par l'OTA et par la gravité des manifestations cliniques dues à son ingestion chez l'homme et chez l'animal.

Nous essaierons de répondre à ces questions en quatre parties : nous définirons d'abord ce qu'est l'OTA et nous montrerons comment elle contamine les aliments, puis nous étudierons les pathologies découlant de sa consommation. Nous verrons alors quels sont les mécanismes de sa toxicité avant de présenter le risque associé à son ingestion pour les animaux et pour l'homme, en France.

**PARTIE 1 : OCHRATOXINE A : NATURE, PROPRIETES ET
ORIGINE**

L'ochratoxine A (OTA), ainsi que les ochratoxines B, C, á et â sont des mycotoxines produites par des moisissures des genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Parmi ces composés, l'OTA est la plus abondante et la plus toxique. Les principales sources d'OTA dans l'alimentation sont les céréales. Cependant, des niveaux importants de contamination peuvent être relevés dans le jus de raisin et le vin rouge, le café, le cacao, les fruits à écale, les épices et les fruits secs. La contamination peut aussi se transmettre à la viande de porc, aux produits à base de sang de porc et à la bière.

P.verrucosum est la source principale de contamination par l'OTA des produits alimentaires stockés dans les climats tempérés, tandis qu'*Aspergillus* spp. domine dans les pays aux climats plus chauds.

Nous verrons quelle est la nature des ochratoxines, quelles sont leurs conditions de synthèse et les niveaux de contamination des aliments dans le monde.

1- OCHRATOXINE A ET DERIVES

1-1-Structure :

1.1.1.ochratoxine A :

L'ochratoxine A a été isolée, pour la première fois, à partir d'*Aspergillus ochraceus*, en 1965, à l'occasion de « screening » sur les moisissures toxigènes. Elle a par la suite été identifiée dans les conditions naturelles, aux USA, en 1969, dans un échantillon de maïs [Weidenburner, 2001] puis dans l'ensemble des pays du monde.

La formule brute de l'ochratoxine A est : C₂₀H₁₈ClNO₆

Son numéro de CAS est 303-47-9 [IARC, 1993].

Sa dénomination scientifique est :

L-Phénylalanine,N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1*H*-2-benzopyranyl-7)-carbonyl]-,(R)- [IARC, 1993, Weidenburner, 2001].

Ou encore :

N-[[*(3R)*-5-Chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phényl-L-alanine

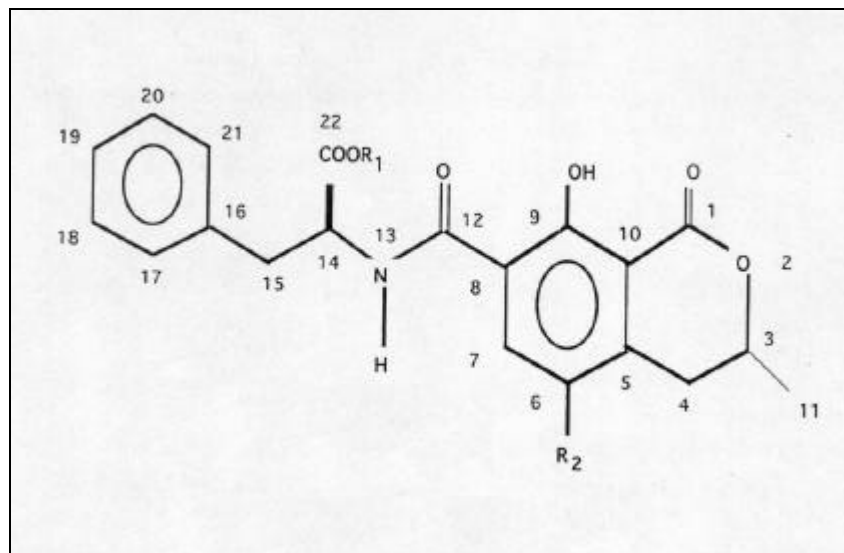
L'OTA est constituée d'une molécule de 3- méthyl- 5- chloro- 8- hydroxy-3,4 dihydroisocoumarine liée, par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carbonyle en C7 au groupement amine de la L-phénylalanine (cf. figure 1).

En fonction des substituants que portent R1, R2, R3 et R4, différentes ochratoxines peuvent être recensées.

1.1.2.dérivés :

Différents dérivés de l'ochratoxine A ont été identifiés, la figure 1 présente les différents composés retrouvés en conditions naturelles notamment les ochratoxines B et C, qui sont, respectivement, l'analoge déchloré et l'ester éthylique de l'OTA [Weidenburner, 2001].

Figure1 : les ochratoxines : contaminants naturels ou métabolites des cultures fongiques [Höhler, 1998]



NOM	R1	R2
Ochratoxine A (OTA)	H	Cl
Ochratoxine B (OTB)	H	H
Ochratoxine C (OTC)	CH ₂ CH ₃	Cl
Ochratoxine A méthyl ester (phénylalanil, méthyl ester)	H	Cl
Ochratoxine B méthyl ester (phénylalanil, méthyl ester)	H	H
Ochratoxine B éthyl ester (phénylalanil, éthyl ester)	H	H

Dans les conditions naturelles, l'OTA existe sous forme de l'épimère R, elle est facilement convertie en épimère S par chauffage, le carbone asymétrique est le carbone 3 [Bruinink *et al.*, 1997].

L'hydrolyse de la liaison peptidique suivie de l'élimination de la phénylalanine donne l'acide carboxylique d'isocoumarine (ochratoxine á ou OTá) [Van der Merwe, 1965a] et l'hydrolyse de l'OTB, son analogue déchloré (ochratoxine â ou OTâ) [Walker, 1999, Van der Merwe, 1965a et 1965b].

1-2-Propriétés physiques et chimiques de l'OTA :

L'OTA pure est un solide blanc, sa masse molaire est de 403,8 g/mol [IARC, 1983].

Son point de fusion est de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène [IARC, 1983].

A pH acide ou neutre, elle est soluble dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle est soluble et stable dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 7,4) ainsi que dans les solutions alcalines aqueuses en général. C'est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1.

Ces propriétés sont à la base de plusieurs méthodes d'extraction. Le mode d'extraction est fondé sur l'état d'ionisation de l'OTA en fonction du pH. En effet, en milieu acide, cette mycotoxine n'est pas ionisée, donc soluble en phase organique. Par contre, en milieu basique, elle se présente sous forme ionisée soluble en milieu aqueux [Pohland *et al.*, 1992].

Ces propriétés expliquent également le faible pouvoir adsorbant des argiles, beaucoup plus actives vis à vis des composés cathioniques voire neutre que vis à vis des composés acides (cf. 1-4.).

L'OTA est optiquement active, son coefficient rotatoire est : $[\alpha]_{21}^D = -46,8^\circ\text{C}$. (c=2,65 mmol/litre dans le chloroforme) [Pohland *et al.*, 1992].

Le spectre d'absorption UV de l'OTA varie en fonction du pH et de la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500/mol*cm dans le méthanol. Dans les mêmes conditions, ce coefficient est de 6400 pour la 4(R)-hydroxyochratoxine A (4 (R)-OH-OTA, un métabolite de l'OTA), alors que l'OTá absorbe à 338 nm avec un coefficient de 5600 et l'OTB absorbe à 318 nm avec un coefficient de 6500. Dans le bicarbonate de sodium (0,1M, pH 7,4) l'OTA a un maximum d'absorption à 378 nm avec un coefficient d'extinction de 14700.

L'ochratoxine A est également fluorescente, elle présente un maximum d'émission à 467 nm dans l'éthanol 96% et à 428 nm dans l'éthanol absolu après excitation à 340 nm. Par ailleurs, après excitation à 365 nm, l'OTA a une fluorescence verte en milieu acide et une fluorescence bleue en milieu alcalin; cette propriété est utilisée pour la détection et le dosage de l'OTA [Azemar, 2000].

Le spectre infra-rouge de l'OTA montre une absorption pour le groupement carbonyle (V_{\max} 1721 cm^{-1}), l'amide secondaire (V_{\max} 1657 cm^{-1}) et la lactone (V_{\max} 1675 cm^{-1}).

L'OTA est relativement stable à la température, elle est en revanche complètement dégradée par l'hypochlorite de sodium [Castegnaro *et al.*, 1991]. Ces propriétés sont utilisées en laboratoire, pour la décontamination du matériel.

Nous reviendrons plus en détail sur la stabilité de ce composé au cours des process industriels de fabrication des aliments (cf. 1-4.).

1-3-Techniques d'analyse :

Le dosage de l'OTA se réalise en trois étapes : l'extraction, la purification et la quantification [Steyn, 1984] (Tableaux 1 et 2).

Les échantillons solides sont broyés et homogénéisés, puis l'extrait est centrifugé et décanté. Pour les substrats liquides, le broyage n'est pas nécessaire. Une purification sur colonne de l'échantillon à doser peut alors être réalisée.

Après filtration et/ou centrifugation, l'extrait est dilué, puis purifié sur colonne d'immunoaffinité.

L'aliquote obtenu peut alors être analysé par CLHP.

Protocole de dosage de l'OTA par la méthode ELISA [Pfohl-Lezzkowicz, 1993b, EHC105]

Des méthodes rapides de détection de l'OTA sont actuellement disponibles sous forme de « kits » : ceux ci utilisent un anticorps anti-OTA. Le seuil de détection de cette méthode immuno-enzymatique est voisin de 10pg/ml de sérum.

Dosage de l'OTA par Chromatographie sur couche mince (CCM)

La détection et la quantification de la mycotoxine peuvent se réaliser sous lampe UV ou, mieux, par fluorescence. Plusieurs protocoles analytiques ont ainsi été développés par l'AOAC (1995), notamment pour la recherche d'OTA dans l'orge ou le café.

La limite de détection est de l'ordre du μ g/kg.

Les coefficients de variation entre les différents laboratoires varient entre 31 et 54%.

La lecture peut se faire visuellement par comparaison des intensités avec des solutions étalons ou bien grâce à un lecteur de fluorodensitométrie, excitation : 310-340nm, émission : 440-475nm.

La fluorescence de l'OTA peut être renforcée, elle vire au bleu intense en présence de vapeurs d'ammoniac ou par vaporisation d'une solution basique (soude, bicarbonate).

Dosage de l'OTA par Chromatographie Liquide Haute performance (CLHP)

La Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) est de plus en plus utilisée. Elle constitue la méthode de référence [Azemar, 2000, EHC 105].

Le système CLHP est muni d'une colonne analytique de type C-18, 5 μ m et la phase mobile, délivrée à un débit de 1ml/min, est composée d'acétonitrile/eau/acide acétique (99 :99 :2,v/v/v). L'acidification de la phase mobile est indispensable sinon l'OTA s'éluerait avec le front de solvant.

La détection par fluorescence est directement possible (excitation : 335 nm et émission : 465 nm).

La plus faible teneur validée est 1μ g/kg sur des matrices telles que blé, orge ou seigle [EHC105].

Méthodes de confirmation:

Des méthodes de confirmation de la présence d'OTA viennent compléter les méthodes de dosage « classiques ». Ainsi la formation du dérivé méthyl ester de l'OTA et sa quantification permettent de confirmer la présence d'OTA dans l'échantillon [Dragacci & Frémy, 1999], une autre méthode est décrite : la rupture enzymatique de l'OTA en OTá et phénylalanine, réalisée par la carboxypeptidase. La quantification de l'OTA est alors basée sur la diminution de l'intensité de fluorescence à 380 nm [EHC105]. On purifie ensuite les échantillons par une

Chromatographie sur Couche Mince (CCM) préparatoire. L'analyse est pratiquée en CLHP avec un détecteur de fluorimétrie, excitation (365nm) émission (421nm) [Dragacci & Frémi, 1999].

Tableau 1 Limites de détection et de quantification des méthodes chromatographiques utilisées pour l'OTA dans les fluides humains et animaux [d'après Valenta, 1998].

Matrice liquide	extraction	rinçage	méthode	LD/ LQ (ng/g) (ng/ml)
Sang, sérum, plasma, lymphes, bile, urine de rat	HCl-CHCl ₃	non	CCM	500
Sérum humain	Dilué avec MgCl ₂ -HCl ;extraction et lavage sur C18-SPE		CCMHP	0,5
Sang, sérum et lait humains	H ₃ PO ₄ -NaCl-CHCl ₃	IAC, dans le lait : LLP et IAC	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,005-0,01
Lait humain	MgCl ₂ -HCl-éthyl acétate	non	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,1
Bile de porc	MgCl ₂ -HCl-CHCl ₃ (pH 1,6-2,0)	Si-SPE et LLP	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,3
Lait humain, de vache et de ratte	HCl-CH ₃ OH-CHCl ₃	Si-SPE et LLP	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,01/0,04, lait de rats : 0,1/0,3
Plasma de porc	Protéines précipitées par CH ₃ OH ; dilution avec H ₃ PO ₄	non	CLHP-FLUO ;pre-C :PSDVb,C :RP18	0,1
Plasma humain	MgCl ₂ -HCl-CHCl ₃	LLP	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,02/0,05
Sérum de porc	Dilué avec MgCl ₂ -HCl ;extraction et lavage sur C18-SPE		CLHP-FLUO ;C :RP18	0,1
Sérum	MgCl ₂ -HCl-CHCl ₃	non	CLHP-FLUO ;C :RP18	1,0
Fluide ruminal	H ₃ PO ₄ -CHCl ₃	LLP	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,1
Sérum de porc	MgCl ₂ -HCl-CHCl ₃ (pH<2,0)	SPE	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,05/0,1
Urine humaine	HCl-CHCl ₃ -CH ₃ OH	CC sur Si et CLHP	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,7
Urine humaine	Incubation avec la β -glucuronidase CHCl ₃	SPE sur Si, CN et C8	CLHP-FLUO ;C : RP18	0,7
Sérum humain	MgCl ₂ -HCl-CHCl ₃	LLP	CLHP-FLUO ;C :RP18	1-2

Tableau 2 Limites de détection et de quantification des méthodes chromatographiques utilisées pour l'OTA dans les tissus humains et animaux [d'après Valenta, 1998].

Matrice solide	extraction	rinçage	Méthode	LD/LQ (ng/g)/ (ng/ml)
Rein de porc	Ethyl acétate- H3PO4	non	ELISA CLHP-FLUO C :RP18	3,9
Tissus de rat	HCl-CHCl3 Direct	non	CCM	500
Rein de porc	H3PO4-CHCl3	LLP	CCM bidimensionnelle	2
Rein de porc	Acide citrique-CH2- Cl2 incubé avec de la subtilisine A, CHCl3	LLP et SPE	CCM	0,2
Rein de porc	H3PO4-CHCl3	Colonne de célite	CCM	10
Tissus animaux	Acide citrique-NaCl- acétone	LLP et CC sur Si	CCM	10
Rein de porc et produits carnés	H3PO4-CHCl3		CLHP-FLUO ;C :RP18	0,2
Rein, foie, muscle et graisse de porc	MgCl2-HCl-CHCl3 (pH 1,6-1,8)	LLP	CLHP-FLUO;C:RP18	0,1-0,2
Fécès de porc	Fécès lyophilisée MgCl2-HCl-CHCl3 (pH 1,6-2,0)	Si-SPE et LLP	CLHP-FLUO ;C :RP18	1,5
Viande et produits carnés	Acide citrique- CH2Cl2(a) ;MgCl2- HCl- CHCl3(pH<1,6)	LLP et Si-SPE IAC	CLHP-FLUO ;C :RP18	0,002-0,005 0,02-0,05

- : non spécifié, LLP : séparation liquide-liquide, C : chromatographie sur colonne, SPE : extraction en phase solide, CIA : colonne d'immunoaffinité, Si : gel Silice, CCM : chromatographie sur couche mince, CCMHP : chromatographie sur couche mince haute performance, CLHP : chromatographie liquide haute performance, FLUO : fluorescence, SM : spectrométrie de masse
THF : tétrahydrofurane, HOAc : acide acétique, NaAc : acétate de sodium, TBAB : bromide de tétrabutyl ammonium, PSDVB : polystyrène divinylbenzène, LD : limite de détection, LQ : limite de quantification, Otá : ochratoxine á, OTB : ochratoxine B, OTC : ochratoxine C, 4-OH-OTA : 4-OH-ochratoxine A, Cit : citriline, AFB1 : aflatoxine B1.

2-LES MOISSURES :

2-1-Généralités :

Les ochratoxines A et B sont produites par les souches de *A.sulphureus*, *A.sclerotiorum*, *A.alliacus*, *A.melleus*, *A.ochraceus*, *A.ostianus*, *A.petrakii* et *A.glaucus*.

De nombreux *Penicillium* sont également producteurs d'OTA : *P.purpurescens*, *P.viridicatum*, *P.palitanus*, *P.commune*, *P.cyclopium*, *P.aurantiogriseum* (Tableau 3).

Tableau 3 : Les différentes espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* productrices d'ochratoxine A [Holmberg et al., 1991]

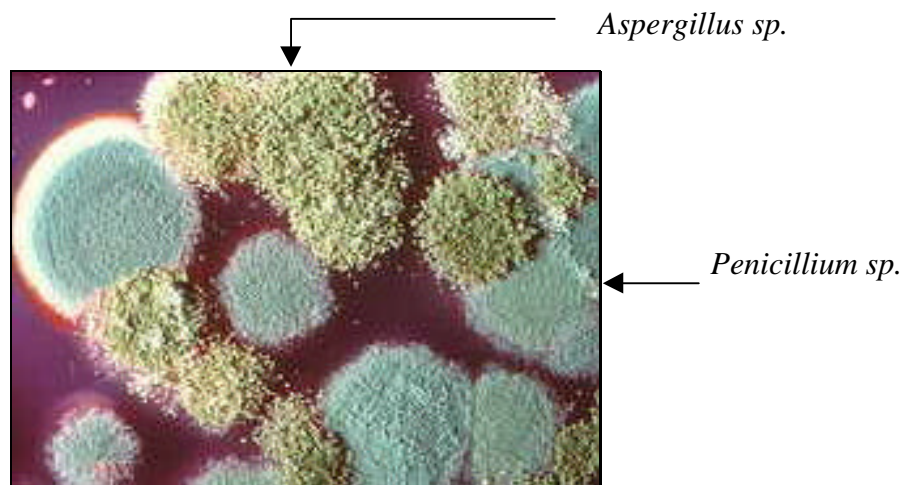
<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>A.ochraceus</i>	<i>P.verrucosum</i>
<i>A.alliaceus</i>	<i>P.chrysogenum</i>
<i>A.elegans</i>	<i>P.commune</i>
<i>A.fresenii</i>	<i>P.cyclopium</i>
<i>A.melleus</i>	<i>P.expansum</i>
<i>A.ostanus</i>	<i>P.palpitans</i>
<i>A.petrakii</i>	<i>P.purpurescens</i>
<i>A.sclerotiorum</i>	<i>P.nordicum</i>
<i>A.sulphureus</i>	<i>P.variabile</i>
<i>A.glaucus (Eurotium herbariorum)</i>	<i>P.verruculosum</i>

Certaines souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* produisent plusieurs mycotoxines, par ailleurs bien souvent les grains contaminés le sont par plusieurs mycotoxines (Tableau 4).

Tableau 4 : Souches de moisissures productrices d'ochratoxine A qui synthétisent, par ailleurs, d'autres toxines néphrotoxiques ou cohabitent avec des moisissures productrices de mycotoxines majeures (aflatoxines, acide penicillique, citrinine) [Creppy et al., 1995]

Moisissures et co-production	Toxines co-produites
<i>P.purpurescens</i>	Citrinine
<i>P.commune</i>	Acide penicillique
<i>P.aurantiogriseum</i> , <i>P.viridicatum</i>	Citrinine, acide penicillique, viomelléine
<i>Aspergillus sulphureus</i>	Acide penicillique
<i>Asp.ochraceus</i>	Acide penicillique, viomelléine
<i>Asp.petrakii</i>	Acide penicillique
Moisissures et co-habitation	
<i>Asp.ochraceus</i> et <i>Asp.flavus</i>	Aflatoxines
<i>Asp.ochraceus</i> et divers <i>Penicillium</i>	Citrinine, patuline, acide cyclopiazonique, acide penicillique, acide kojique, etc.

La photographie 1 montre qu'à partir d'un même milieu de culture, on peut obtenir la pousse d'*Aspergillus* sp. et de *Penicillium* sp.



Photographie 1 : Cohabitation d'*Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. [258].

Dans les conditions naturelles de contamination des aliments, *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum* sont les principaux producteurs d'OTA (Tableau 5).

Tableau 5 :Exemples de produits contaminés par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium viridicatum* [CAST, 1989]

<u>DENREES</u>	<u>ESPECES TOXIQUES CONTAMINANTS</u>
Blé, Farine, pain, maïs, chips	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Arachide, noix	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao, houblon	<i>Penicillium viridicatum</i>
Viandes, porc salé, fromage	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>
Poivre noir et rouge, pâtes	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Fèves, orge, maïs, sorgho, soja	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>
Pâtisserie réfrigérée ou congelée	<i>Penicillium viridicatum</i>
Denrée alimentaire (stockage domestique)	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>

L'isolement et l'identification des espèces se réalisent dans les conditions suivantes : les échantillons de céréales sont examinés après le dépôt de l'échantillon directement dans une boîte de pétri ou à la suite d'une dilution.

Les milieux utilisés pour l'incubation sont le dichloran-glycerol (DG18), le dichloran-rose bengale-chlorotétracycline (DRBC) et le dichloran-rose bengale-yeast extract-sucrose (DRYES).

Après incubation, les colonies sont décomptées, des UFC (Unités Formant Colonies) par gramme d'aliment sont mesurées. Les boîtes sont examinées grâce à un microscope binoculaire [Holmberg *et al.*, 1991].

L'identification microscopique des *Aspergillus* est assez aisée, par contre pour *P.verrucosum*, on recherche les critères suivants :

- une classification microscopique comme verticillata [Krogh, 1978]
- une croissance lente avec des colonies de diamètres respectifs : 13-18mm sur MEA (malt-extract 2% agar) ; 18-24mm sur CYA (Czapek yeast autolysate agar) [Pitt, 1987].
- une couleur violet-marron sur DRYES.

2-2-Les moisissures :

2.2.1.Aspergillus :

Le genre *Aspergillus* a une distribution ubiquitaire, mais il tend à prédominer dans les pays tropicaux. Les *Aspergillus spp.* sont les colonisateurs des produits stockés, ce sont de bons indicateurs des conditions de stockage car chaque espèce a des besoins en eau (aw) distincts.

Aspergillus alutaceus var. alutaceus : (A.ochraceus)

Il s'agit d'un Deutéromycète de l'ordre des Hyphomycètes, de la famille des Monoliaceae.

Les *Aspergillus* poussent rapidement, ils sont poudreux ou duveteux, de couleur variable : blanc, vert, brun à noir.

Ils se caractérisent par la formation d'organes de reproduction asexués : les têtes aspergillaires (figure 2). Le conidiophore, de longueur variable (environ 1500 à 2000 µm), se renfle à son extrémité terminale formant une vésicule globuleuse (photographie 2, figure 2), à partir de celle-ci se forment des phialides, soit directement, soit par l'intermédiaire de métules.

Les phialides forment des conidies unicellulaires, basipétales disposées en chaînettes. Quelques espèces produisent des cléistothèces.

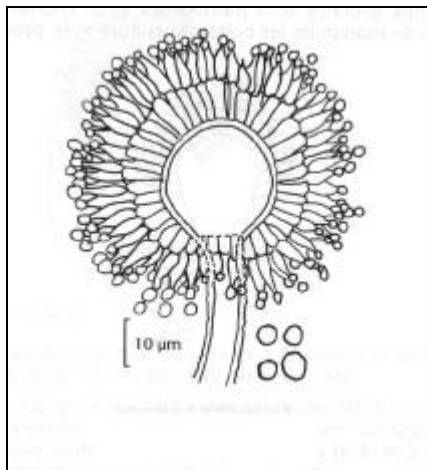
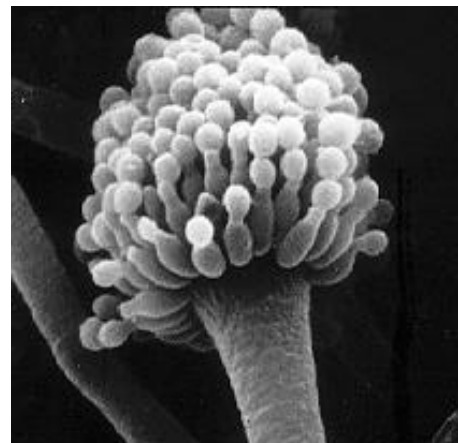


Figure 2 : Aspergillus ochraceus [17]



Photographie 2 Tête aspergillaire en microscopie électronique [251]

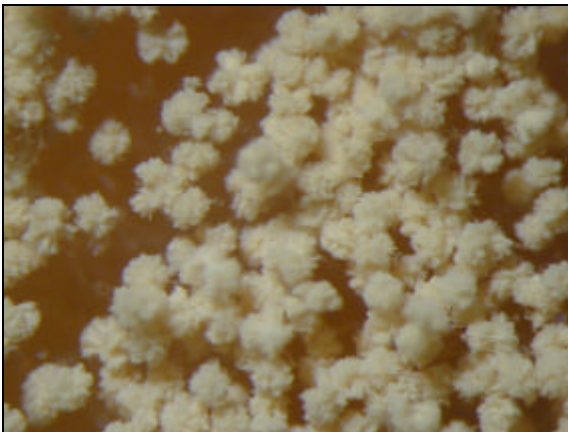
Le diagnostic repose sur :

- la présence de filaments hyalins, cloisonnés, ramifiés, de diamètre constant à l'examen direct
- la culture : apparition rapide de colonies d'aspect granuleux et de couleur ocre (photographie 3) caractéristique sur milieu de Sabouraud chloramphénicol ou sur milieu de Czapek.

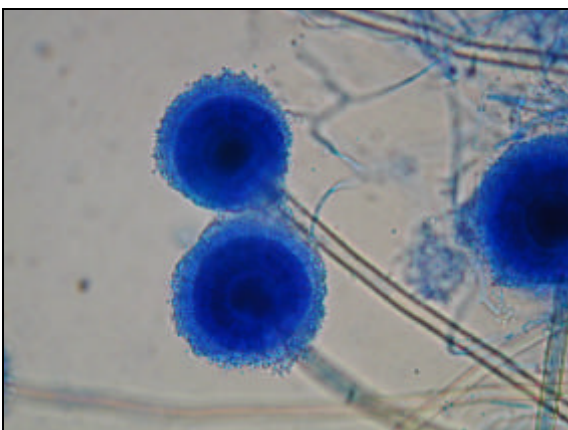


Photographie 3 *Aspergillus ochraceus* en culture [Dr J.D. Bailly]

L'examen microscopique (photographies 4 et 5) permet une identification précise par les caractéristiques de la tête aspergillaire bisériée, le plus souvent, et de forme radiaire..



Photographie 4 Colonies d'*Aspergillus ochraceus* à la loupe binoculaire [Dr J.D. Bailly]



Photographie 5 Têtes aspergillaires en microscopie optique [Dr J.D. Bailly]

C'est une moisissure des céréales, le plus important producteur d'OTA du genre *Aspergillus*. Le minimum d'aw pour *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* permettant la production d'OTA est 0,97-0,99.

Pour aw >0,97, la production est optimale [Weidenburner, 2001]

Aspergillus ochraceus est un champignon phytopathogène et cosmopolite, largement retrouvé dans le sol et les végétaux en décomposition (photographies 6 et 7), il est responsable de la pourriture des pommes, des poires, des raisins...



Photographie 6 Maïs contaminé par des moisissures du genre *Aspergillus* [255]



Photographie 7 Grappe de raisins contaminée par des moisissures du genre *Aspergillus* [255]

Aspergillus ochraceus est rarement pathogène chez l'homme, il peut provoquer de rares onychomycoses. En revanche il peut attaquer certains insectes (vers à soie). L'aspergillose pulmonaire, une maladie grave de l'appareil respiratoire est provoquée par l'inspiration de spores d'*Aspergillus fumigatus* ou *Aspergillus niger*. Celles ci peuvent proliférer dans les conduits d'aération et sont redoutées dans certains services hospitaliers où sont soignés les

cancéreux ; chez l'animal, les « aspergilloses » peuvent être à l'origine d'avortements [Weidenburner, 2001].

2.2.2. *Penicillium* :

Cette moisissure ubiquiste est surtout répandue dans les régions à climat tempéré comme le Canada et l'Europe du Nord.

Bien que généralement classées comme des moisissures de stockage, certaines espèces de *Penicillium* contaminent les céréales et les grains avant la récolte.

Les *Penicillium spp.* sont les organismes dominants des « moisissures bleues et vertes » associées au pourrissement des aliments, en particulier les fruits et les légumes (photographies 8, 9 et 10).

85 espèces sont connues pour être toxigènes, mais la plupart des mycotoxines sont produites par un petit nombre d'espèces.

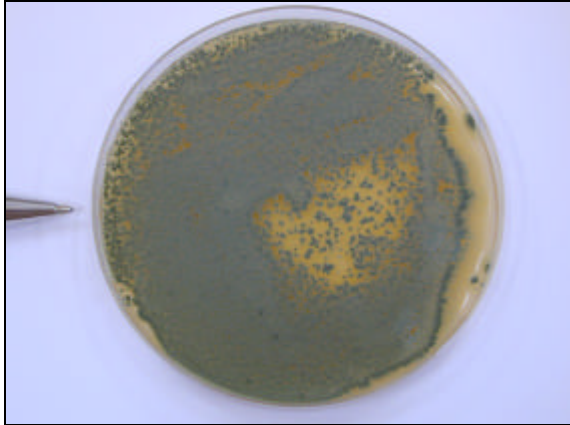
Des aw comprises entre 0,80 et 0,82 sont suffisantes pour assurer la croissance de *P.aurantiigriseum* et *P.verrucosum*, alors que des aw de 0,86 à 0,89 sont nécessaires pour la production de mycotoxines [Weidenburner, 2001].

En général, les espèces de *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines à des températures inférieures à celles nécessaires aux espèces d'*Aspergillus* [Weidenburner, 2001].

***Penicillium verrucosum* Dierckx**

C'est une moisissure très commune dans les régions tempérées du monde (spécialement au nord de l'Europe).

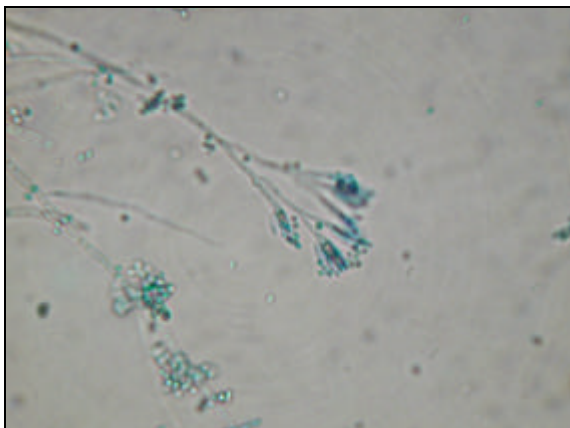
Les céréales (maïs, blé, orge) sont les plus fréquemment contaminées. Une corrélation positive entre la teneur protéique de l'orge et la production d'OTA a même été établie [Weidenburner, 2001].



Photographie 8 *Penicillium viridicatum* en culture [Dr J.D. Bailly]



Photographie 9 Colonies de *Penicillium viridicatum* à la loupe binoculaire [Dr J.D. Bailly]



Photographie 10 *Penicillium viridicatum* en microscopie optique [Dr J.D. Bailly]

2-3-Toxinogénèse :

2.3.1.Voies de synthèse

L'OTA est produite par différentes moisissures, des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, notamment *Aspergillus ochraceus*, qui lui a donné son nom, et *Penicillium viridicatum*, mais aussi *A.sulphureus*, *A.ostaninus* et *A.sclerotiorum* [Walker, 1999, Van Der Merwe *et al.*, 1965a et 1965b, Steyn & Holzapfel, 1967].

Ces moisissures se développent principalement sur les céréales et les oléagineux.

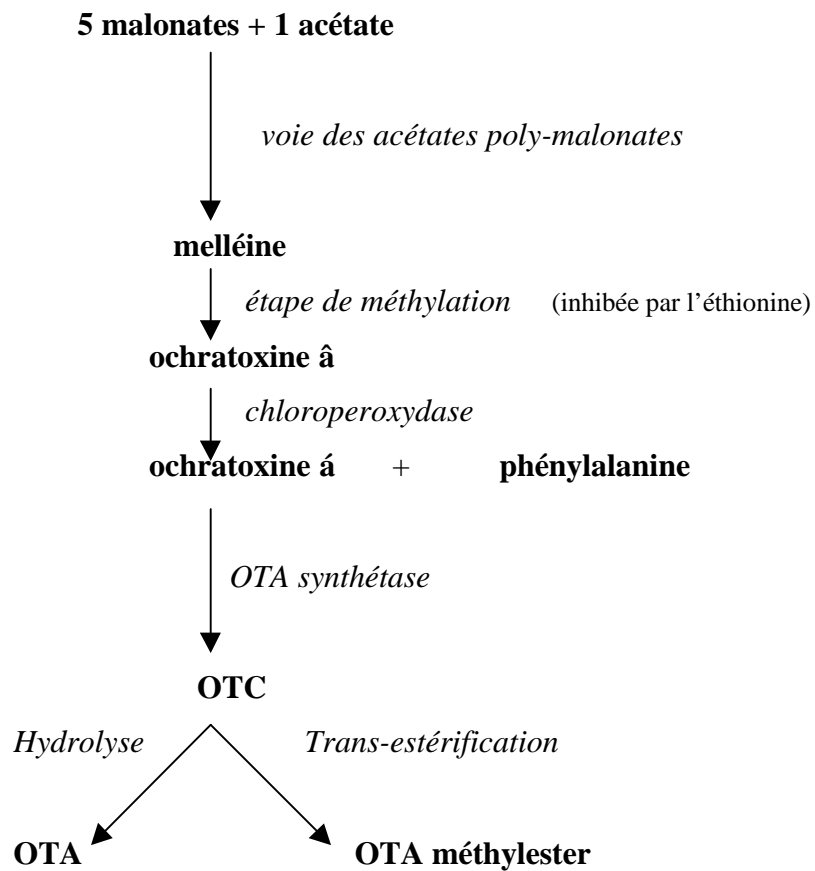
L'élaboration de l'OTA est alors assujettie à différents facteurs, biologiques, physiques et chimiques [D'Mello & Mac Donald, 1997].

Après la contamination de l'aliment, quand les conditions de développement sont satisfaisantes, il y a germination des spores et croissance d'un mycélium. La reproduction sexuée se fait par l'intermédiaire de spores internes, il s'agit d'ascospores contenues dans des asques à l'intérieur de périthèces clos. La multiplication asexuée se fait par des conidies qui se forment sur le mycélium. La spore et le mycélium sont les gros producteurs d'ochratoxine A. Dans le cas où les conditions de développement sont difficiles (faible humidité), les spores ne germent pas, il apparaît alors des hyphes cloisonnées mais d'une moindre toxicité. Si les conditions sont encore plus dures, les spores se transforment en chlamydospores très résistantes.

L'OTA est constituée d'une dihydroisocoumarine (le dérivé pentakétide OTá) liée à la phénylalanine au niveau du groupe carboxyl. Les analogues déchlorés correspondant sont les OTB et OTâ. Comme l'OTá, l'OTâ et la mélléine ont été isolées des fermentations ochratoxinogéniques d'*A. ochraceus* [Harris & Mantle, 2001].

La biosynthèse de l'OTA a été étudiée grâce à des précurseurs marqués :

Figure 3 Schéma de synthèse de l'OTA [Harris & Mantle, 2001].



La voie des acétate-polymalonates entraîne la production d'un polypeptide aromatique : la melleïne. Après réduction du carbonyle en C3 et méthylation, on obtient l'OTâ, la chloroperoxydase assure la chlorination en OTá.

L'éthionine, qui est un inhibiteur de la méthylation inhibe complètement la production d'OTA.

Une enzyme libre de la cellule : l'OTA synthétase, qui a besoin d'ATP et d'ions Mg⁺⁺ catalyse la liaison de l'OTá avec la phénylalanine.

2.3.2. Facteurs déterminant la contamination des aliments par les moisissures ochratoxinogènes et la production d'OTA, en conditions naturelles :

Nous évoquerons, par ordre d'importance décroissante, les facteurs déterminants dans la contamination des aliments par les moisissures ochratoxinogènes et dans la biosynthèse de l'OTA par ces moisissures.

- La teneur en eau :

Tableau 6 : croissance des moisissures et humidité [Derache, R. & Derache, P., 1986]

Humidité en % (20°C)	Moisissures
10-17	<i>Asp.glaucus</i>
14.5-16.5	<i>Asp.ochraceus</i>
15.6-22	<i>P.viridicatum</i>
18-19.5	<i>Asp.flavus</i>
18.4	<i>Fusarium moniliforme</i>
22.2	<i>F.roseum var.graminearum</i>
21.2-33	<i>Fusarium</i>

Rappelons que l'activité en eau, notée aw, représente le rapport de la tension de vapeur du produit sur l'eau pure. Ce facteur tient compte de l'équilibre de l'eau disponible entre le substrat et l'air ambiant, à une température donnée [Pfohl-Leszkowicz, 1999a].

Tableau 7 : Conditions minimales et optimales de production d'OTA par *P.viridicatum* sur le blé et sur l'orge.

Humidité	Blé	Orge
Optimum % d'humidité à 24°C	21.8	27.1
Minimum % d'humidité à 24°C	18.5	21.6
Minimum de température % d'humidité	4 28.6	4 40.5

- **La nature du substrat :**

Les arachides et le soja sont plus fréquemment contaminés par l'ochratoxine A formée par *Aspergillus alutaceus* que le colza, le blé ou le maïs. Le meilleur substrat pour la production d'ochratoxine A par *Penicillium verrucosum* est le maïs [Madhyastha *et al.*, 1990]. Cette spécificité de substrat provient de différences physiques (activité en eau, conductivité thermique, oxygénation) et chimiques (composition en lipides, protéines, acides aminés, acide gras, minéraux). La proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'OTA par *A.alutaceus* et *P.verrucosum*. Il y a proportionnalité entre le taux de protéines contenu dans l'orge et l'apparition d'OTA [Häggbloom & Ghosh, 1985].

En général, la composition du milieu, spécialement la présence ou l'absence de micronutriments comme les ions métalliques, influence plus fortement la biosynthèse de l'OTA que la croissance des moisissures [Weidenburner, 2001]. Les tableaux 6 et 7 illustrent bien l'influence de la nature du substrat sur la croissance de *Penicillium viridicatum* : sur milieu de culture, sa croissance est optimale pour une humidité de 15.6 à 22%, alors que sur l'orge, sa croissance est optimale pour un pourcentage d'humidité de 27.1.

- **la température :**

P.cyclopium et *P.viridicatum* poussent et produisent l'OTA dans des gammes de températures bien plus larges qu'*Aspergillus ochraceus*. D'une manière générale, la majorité des *Penicillia* est capable de se développer à des températures basses, contrairement aux *Aspergillii*. Ainsi, la croissance de *P.viridicatum* peut avoir lieu entre 0 et 31°C, à aw 0,95, alors que la synthèse d'OTA ne pourra avoir lieu qu'entre 12 et 24°C.

La température optimale de production de l'OTA par *Aspergillus ochraceus* est en revanche de 28°C [Trenk *et al.*, 1991]. Au contraire, *Penicillium viridicatum* croît dans une gamme de températures qui varie de 4 à 30°C, en présence d'une humidité de 22% [Mislivec & Tuite, 1970].

En conclusion, dans les régions tempérées à froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillia*, alors que dans les régions chaudes, aux climats tropicaux et subtropicaux, elle est produite par les *Aspergillii* [Pohland *et al.*, 1992, Varga *et al.*, 1996]

- **la teneur en oxygène :**

Dans l'ensemble, un accroissement de la teneur en gaz carbonique du milieu diminue et supprime la croissance des moisissures ochratoxinogènes.

La formation d'OTA par *Aspergillus ochraceus* est totalement inhibée à 30% de CO₂, à 80% de CO₂, le champignon ne pousse plus [Paster *et al.*, 1983]. En outre, la sensibilité du champignon au CO₂ est influencée par la disponibilité en eau et par la température.

Un produit peu compressible comme le maïs, l'arachide,...laisse un espace interstitiel important donc un volume gazeux riche en oxygène, ce qui est propice au développement de moisissures de stockage comme *Aspergillus* et *Penicillium* [Derache, R. & Derache, P., 1986].

2.3.3.Facteurs favorisants :

- **Effets des contaminations conjointes : [Lee & Magan, 2000]**

Aspergillus ochraceus est un colonisateur important du maïs cependant il entre en compétition avec d'autres contaminants : *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium sp.*, dans la « niche » maïs grain.

Pour une $a_w = 0,95$ et à 18°C, *Asp.flavus* est dominé par *Asp.ochraceus* alors que *Asp.flavus* est dominant à 30°C. *Eurotium amstelodami* est dominant à 18 et 30°C

Pour une a_w de 0,995, *Asp.ochraceus* est dominant contre *Asp.candidus* et *E.amstelodami* à 18°C, *Asp.ochraceus* est dominant contre *Alternaria alternata* à 30°C.

Il y a une inhibition mutuelle entre *Asp.ochraceus* et *Asp.candidus* et avec *E.amstelodami*, à 30°C.

En l'absence de compétition, à 30°C, *Asp.ochraceus* produit significativement plus d'OTA à $a_w=0,95$ qu'à $a_w=0,995$.

Cependant, les niveaux d'OTA sont significativement réduits par les interactions avec les autres espèces. Une réduction significative de la production en OTA a ainsi lieu lors de contaminations conjointes. Ce phénomène est plus particulièrement important avec *Asp.candidus* à 18°C et *Asp.niger* et *E.amstelodami* à 30°C [Lee & Magan, 2000].

- **Acidité du milieu :**

La production d'OTA par *Penicillium viridicatum* est maximale à pH 5,6 [Patterson & Domoglou, 1986], en effet l'OTA se forme préférentiellement sur les aliments acides [Cuero & Smith, 1987]

- **Insectes :**

Dans les régions tropicales, la contamination des grains par les moisissures se fait aux champs et pendant le stockage.

Les insectes et les acariens sont les vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain, par les lésions qu'ils créent [Ominski *et al.*, 1994].

Les oiseaux et les rongeurs interviennent de façon similaire.

- **Conditions de stockage :**

L'humidité et les climats froids favorisent la production de l'ochratoxine A par *A.ochraceus* et *P.viridicatum* lors du stockage de certaines denrées comme le café, l'orge, l'avoine, le seigle, le blé, les fourrages et les ensilages (Tableau 8) [D'Mello & Macdonald, 1997, Scudamore & Livesey, 1998]

Tableau 8 :Conditions de stockage favorisant l'ochratoxinogénèse :

Moisissures	Denrées	Conditions favorisantes
<i>A.ochraceus</i> <i>P.viridicatum</i>	Café, orge, avoine, seigle, blé	Humidité en stockage Climats froids et humides

3-CONTAMINATION DES ALIMENTS

3-1-Répartition et niveaux de contamination :

L'analyse des niveaux de contamination dans les différents pays du monde semble révéler une contamination plus importante en Europe que dans le reste du monde (Tableau 9a). Signalons toutefois que ces résultats peuvent être faussés par le nombre d'analyses effectué (plus important dans les pays développés).

En Europe, les concentrations les plus élevées ont été trouvées plus particulièrement dans les pays de l'Est: en Pologne la contamination en OTA atteint 1 à 4 ppm. Le climat rencontré dans les Balkans ou la Scandinavie est en effet favorable au développement des champignons producteurs d'ochratoxine A lors de la moisson et après, lors de l'entreposage de la récolte.

En Amérique, (Tableau 9b) [EHC105] les échantillons les plus contaminés ont été identifiés au Canada (la contamination en OTA pouvant atteindre 4 à 6 ppm), alors qu'aux USA et, plus encore, en Amérique du Sud, les niveaux de contamination sont faibles (de l'ordre de quelques ppb) [Osweiler & Galey, 2000]. On peut penser que les facteurs climatiques jouent un rôle prépondérant et que les climats tempérés du Nord se prêtent mieux à la contamination par l'OTA.

Tableau 9a : niveaux de contamination en OTA en Europe

Pays	Produit	Année	Echantillons positifs/nb total	Concentration (µg /kg)
Europe				
Autriche	Aliment pour animaux	1986	30/170	100-1000
Bulgarie	Mã s	1984-89	103/264	0,2-1418
Bulgarie	pois	1984-89	86/260	0,05-285
France	Mã s	1973	18/924	5-200
Allemagne	orge	1982-87	10/68	0,1-206
Allemagne	blé	1982-87	94/719	0,1-12,5
Allemagne	Céréales	1973-88	24/765	Moyenne, 11,8
Allemagne	son	1973-88	9/84	6,8
Allemagne	farine	1973-88	17/93	2,2
Italie	Pain	1976-79	1/1	80000
Norvège	Céréales	1973-88	11/538	2-180
Pologne	Aliments pour animaux(mixte)	1966,87	18/1240	10-200
Pologne	Céréales	1984-85	158/1353	5-2400
Pologne	Pain	1984-85	63/368	Moyenne, 1360
Pologne	farine	1984-85	48/215	Moyenne, 4370
Suède	pois	1976-79	6/91	10-442
Suède	Céréales	1972	7/84	16-410
Royaume Uni	Pain	NR	1/50	210
Royaume Uni	orge	1976-79	51/376	<25-5000
Royaume Uni	blé	1976-79	15/101	<25-2700
Royaume Uni	Aliments pour animaux	1976-79	27/812	<25-250
Royaume Uni	Céréales cuisinées	1976-79	12/243	5-108
Yougoslavie	Mã s	1972-76	45/542	19-140
Yougoslavie	blé	1972-76	11/130	19->100

Tableau 9b : niveaux de contamination sur le continent américain :

Pays	Produit	Année	Echantillons positifs/nb total	Concentration (µg /kg)
<u>Amérique du Nord</u>				
Canada	Blé, foin	1971-75	7/95	30-6000
Canada	Grains, fourrages	1971-79	5/474	30-4000
Canada	céréales	1976-78	6/315	3-8
Canada	céréales	1981-83	5/440	10-50
Canada	Pois, haricots	1979	1/84	20
USA	Mais	1968-69	3/293	80-170
USA	Blé	1970-73	11/577	Trace-120
USA	orge	NR	23/182	10-29
USA	orge	NR	18/127	10-40
<u>Amérique du Sud</u>				
Brésil	farine	1985-86	2/33	30,70
Brésil	pois	1985-86	2/13	90, 160
Brésil	Grains de maïs blanc sec	1985-86	1/12	30
Chili	Mais	NR	1/28	55

Sur le continent Africain (Tableau 9c), les niveaux de contamination relevés demeurent faibles (de 10 à 34 ppb) sauf en Tunisie où ils avoisinent ceux qu'on peut rencontrer en Europe, (et atteignent des valeurs dix fois supérieures) ceci peut être dû aux traditions de stockage des aliments dans ce pays : les denrées conservées pendant de longues périodes sont exposées au développement des moisissures ochratoxinogènes (cf. 2.2.3).

Tableau 9c : niveaux de contamination sur le continent africain :

Pays	Produit	Année	Echantillons positifs/nb total	Concentration (µg /kg)
<u>Afrique</u>				
Egypte	blé	NR	1/3	10
Egypte	Mais	NR	1/3	12
Egypte	Aliment mélangé	NR	2/3	Moyenne, 19
Sénégal	pois	1984-88	5/31	Moyenne, 34
Tunisie	blé	1982-83	8/28	34-360
Tunisie	Aliments pour animaux	1982-83	3/10	140-360

En Asie (Tableau 9d), la contamination est faible même si la plupart des produits céréaliers destinés à l'alimentation humaine sont contaminés par une ou plusieurs moisissures potentiellement toxigène [Begum & Samajpati, 2000].

Une valeur de contamination relevée en Australie est particulièrement élevée (70 ppm) : elle met l'accent sur le fait que des niveaux élevés peuvent être rencontrés dans certains cas de figures.

Tableau 9d : niveaux de contamination en Australie et en Asie :

Pays	Produit	Année	Echantillons positifs/nb total	Concentration (µg /kg)
<u>Australasie</u>				
Australie	Aliments pour animaux	1971-80	1/25	70000
Inde	Riz	1981	2/32	8,25
Inde	Copra	1982-83	1/384	50
Indonésie	Mâ s	1985-86	1/26	3
Japon	Farine	1977-82	11/11	<2,5-20

3-2-Moyens de lutte :

Différents moyens de lutte peuvent être envisagés suivant qu'ils se destinent aux moisissures ou à l'OTA.

3.2.1.Moyens de lutte contre les moisissures :

Une fois la plante contaminée dans les conditions de terrain, la moisissure continuera de se développer pendant les stades après récolte et l'entreposage [Lopez-Garcia & Park, 1999].

L'humidité et la température sont les principaux facteurs dont il faut tenir compte dans la planification de toute stratégie de lutte contre le développement des moisissures ochratoxinogènes. Une forte teneur en eau et une humidité ambiante relativement élevée sont indispensables pour la germination des spores et la prolifération des *Aspergillus* et des *Penicillium* [Frank, 1999].

Dans la lutte contre la contamination des aliments par des moisissures ochratoxinogènes, une attention particulière est nécessaire au moment du stockage : il faut contrôler certains facteurs comme le moment opportun de la récolte, le nettoyage et le séchage du produit agricole [Walker, 1999, Frank, 1999].

3.2.2 Moyens de lutte contre l'ochratoxine A :

La prévention est la meilleure stratégie de lutte, mais il peut y avoir malgré tout une contamination par les mycotoxines. Les procédures de lutte et de décontamination après la récolte constituent donc une barrière importante pour éviter l'exposition des consommateurs. Dans les stratégies de décontamination, il faut s'astreindre à respecter certains objectifs : inactiver, détruire ou éliminer la toxine sans produire ou laisser de résidus toxiques dans les produits d'alimentation humaine ou animale, respecter la valeur nutritive et l'acceptabilité du produit pour l'alimentation humaine ou animale, ne pas altérer les propriétés technologiques du produit [Frank, 1999, Riley & Norred, 1999].

Méthodes physiques pour l'élimination de l'ochratoxine [Lopez-Garcia & Park, 1999]

Pendant la fabrication de farines, ni le nettoyage ni le moulage (sec ou humide) n'éliminent l'OTA d'échantillons d'orge ou de blé naturellement contaminés. Après moulage, des niveaux similaires d'OTA ont été retrouvés dans la farine et le son. Après un moulage humide expérimental de maïs, contaminé par les ochratoxines A et B, il a été montré que 43% de l'OTA qui reste dans le maïs trempé, sont ensuite éliminés dans les eaux de traitement et dans les substances solubles des traitements ultérieurs, 4% se retrouvent dans le germe et 51% dans le gruau (amidon, fibres et gluten) [Weidenburner, 2001].

Le battage (retrait des enveloppes externes du péricarpe) comme procédure de nettoyage additionnée, permet une élimination de 50% de l'OTA du blé.

Désactivation thermique :

Céréales et produits dérivés :

Des températures de 250°C ne sont pas suffisantes pour assurer une dégradation complète de l'OTA même s'il a été rapporté que le chauffage de la farine blanche à 250°C pendant 40 minutes permet une réduction considérable (76%) de la teneur en OTA [Weidenburner, 2001].

Lors du traitement de grains naturellement contaminés par l'OTA, il a été montré qu'après traitement par chauffage, environ 53% de l'OTA sont retrouvés [Lopez-Garcia *et al.*, 1999]

L'OTA semble être plus facilement détruite dans des céréales sèches qu'en présence d'eau. Ainsi, l'OTA n'est pas dégradée pendant la confection du pain, mais 62% disparaissent au cours de la cuisson des biscuits car ils ont une teneur en eau plus basse [Weidenburner, 2001]. Le trempage, la cuisson ou la mise en conserve des haricots permet une petite diminution de la concentration en OTA (10 à 34%) [Lopez-Garcia *et al.*, 1999].

Le grillage du café donne les résultats les plus variables, avec une décontamination qui varie de 0 à 100%. En fait différents facteurs ont une influence : les conditions du grillage, l'hétérogénéité de la contamination, les concentrations en OTA et la performance de la méthode analytique. Quant à savoir si l'OTA contamine le café brassé, les opinions divergent [Weidenburner, 2001]. L'analyse de plus de 600 échantillons de café choisis en Europe a montré que leur grande majorité n'était pas du tout contaminée et que les quelques échantillons contaminés l'étaient à de très faibles niveaux (moins de 30 µg/kg).

Enfin, on a pu constater que la contamination des grains diminue lentement au cours du temps : ainsi, sur un orge naturellement contaminé, un stockage de deux ans a réduit la concentration en OTA des grains de plus de 60% [Weidenburner, 2001].

Viandes et produits d'origine animale :

Une diminution de 20% environ de la contamination est obtenue au cours de la friture des boudins, des reins et des tissus musculaires des porcs. En revanche la friture (150-160°C) est inefficace dans la décontamination du tissu adipeux [Weidenburner, 2001].

Pendant le séchage de saucisses, l'OTA est modérément stable.

Le stockage du fromage à température ambiante entraîne, lui, une diminution significative de la concentration d'OTA [Weidenburner, 2001].

Décontamination biologique :

La fermentation alcoolique semble inefficace dans la décontamination : 91 à 96% de l'OTA demeurent après le traitement du malt lors de l'élaboration de la bière et rien n'est détruit pendant la pasteurisation de la bière.

Un taux de transmission variant de 2 à 28% de l'OTA de l'orge dans la bière a été observé quand des lots très contaminés sont utilisés.

Au bilan on retrouverait 20 à 30% de la concentration en OTA initiale dans le produit fini [Weidenburner, 2001].

Adsorbants :

Les résultats obtenus avec les aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés ne sont que partiels, les propriétés adsorbantes du bentonite vis à vis de l'OTA sont variables et fonction du pH. Le charbon activé a un net effet protecteur quand il est administré à de fortes doses (5 à 10 % de l'aliment) mais il entraîne une diminution des concentrations plasmatiques de vitamine E.

Les résines comme la colestyramine incorporées à 1 ppm dans l'alimentation diminuent les concentrations plasmatiques en OTA [Guerre, 2000].

Décontamination chimique :

Une décontamination de l'OTA dans les produits de laboratoire peut être réalisée par ajout d'hypochlorite de sodium [Dragacci & Frémy, 1999] ou de permanganate de potassium [Dragacci & Frémy, 1999] (Tableau 10).

Tableau 10 Domaine d'application des méthodes chimiques de destruction et de décontamination de l'ochratoxine dans les rejets de laboratoires :[Dragacci & Frémy, 1999]

Nature des produits à décontaminer	OTA
Composés solides	1-2
Solutions aqueuses	1-2
Solutions organiques (solvants volatils)	1-2
Solutions de DMF ou DMSO	1
Solutions organiques (solvants non volatils) miscibles à l'eau	-
Verrerie et vêtements de protection	1-2
Litière	-
Plaques de CCM	1
Piluliers	1-2

N°1 : destruction de l'OTA par l'hypochlorite de sodium

N°2 : destruction de l'OTA par le permanganate de potassium en milieu alcalin.

A des concentrations subinhibitrices, la phosphine augmente la concentration en OTA, tandis que la biosynthèse est inhibée par le dichlorvos à des concentrations qui ont relativement peu d'effet sur la croissance des moisissures.

Les additifs alimentaires antimicrobiens comme le méthyl parabène, le propionate sodium et le sorbate potassium inhibent la croissance et la production d'OTA par *A.sulphureus* et *P.verrucosum* [Weidenburner, 2001].

L'irradiation ($\leq 10\text{kGy}$) stimule la production d'OTA par *A.ochraceus* [Weidenburner, 2001].

CONCLUSION

L'ochratoxine A est synthétisée par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Le développement des moisissures toxigènes est favorisé par des conditions climatiques particulières : les climats tempérés de l'hémisphère nord sont particulièrement propices. L'ochratoxine résiste à de nombreux traitements physiques et chimiques et on la retrouve dans les aliments destinés aux animaux et à l'homme.

Dans la deuxième partie, nous envisagerons l'étude des manifestations cliniques dues aux intoxications par l'OTA en conditions naturelles.

PARTIE 2. LES OCHRATOXICOSES

Dans les conditions naturelles, les manifestations cliniques liées à l'intoxication par l'ochratoxine sont voisines dans la plupart des espèces affectées, cependant les animaux diffèrent de par leur sensibilité à la mycotoxine.

Les porcs sont les plus sensibles à l'OTA alors que chez les volailles les ochratoxicoses ont surtout un impact économique.

Dans d'autres espèces, comme les chiens ou les ruminants, les niveaux de contamination naturels ne suffisent pas à l'expression de signes cliniques évocateurs.

Chez l'homme, enfin, l'OTA est impliquée dans une pathologie rénale décrite dans les pays d'Europe de l'Est : la néphropathie endémique des Balkans.

1-L'ESPECE PORCINE

1-1-Présentation :

La « néphropathie porcine mycotoxique » a été mise en évidence pour la première fois au Danemark, avec l'utilisation de seigle moisi contaminé par de l'OTA.

Des études effectuées au Danemark, en Hongrie, en Scandinavie et en Pologne ont confirmé le rôle majeur de l'OTA dans l'étiologie de cette affection [Krogh *et al.*, 1973].

A des concentrations comprises entre 0,5 et 1 ppm dans l'alimentation, la néphrotoxicité est seule observée, à des concentrations plus élevées parfois rencontrées dans des conditions extrêmes, on a des effets extrarénaux tels une atteinte du foie, des intestins, des organes lymphoïdes, de la rate et des leucocytes.

La variabilité symptomatologique rencontrée est probablement due aux différences dans les périodes d'exposition et aux quantités de néphrotoxines ingérées par les animaux [Humphreys, 1988].

1-2-Symptômes :

Le niveau de contamination des aliments conditionne l'expression clinique de l'ochratoxicose : une ochratoxicose « chronique » sera observée si l'exposition est faible mais de longue durée, alors qu'on aura une ochratoxicose « aiguë » quand les aliments sont très contaminés.

- **Forme chronique :**

L'affection est le plus souvent difficile à caractériser. Elle se traduit par une diminution de la croissance, de l'indice de conversion alimentaire, du gain de poids et de la consommation alimentaire chez les porcelets [Cook *et al.*, 1986].

L'organe le plus touché est le rein : l'atteinte se manifeste par de la polyuropolydypsie. Ce syndrome s'exprime dans les élevages par un sol constamment humide, une consommation excessive d'eau, l'augmentation de la fréquence des mictions, et une situation qui s'aggrave malgré l'emploi d'antibiotiques [Cook *et al.*, 1986].

Dans une série d'expérience, des groupes de 3 à 6 porcs ont reçu de l'OTA, dans l'alimentation, à des doses de 0; 0,2; 1 et 5 ppm par jour, ce qui équivaut approximativement à 0; 0,008; 0,04 et 0,2 mg/kg PV/jour sur des périodes de 5 jours sur 7, pendant 8 et 12 semaines et jusqu'à 2 ans. Il a été rapporté une baisse de la fonction rénale, des néphropathies progressives et une réduction de l'activité des enzymes rénales.

Une néphropathie progressive sans atteinte rénale a été notée chez les porcs à qui on avait donné un aliment contaminé par l'OTA à 1 ppm pendant 2 ans [Krogh & Elling, 1977, Elling, 1979a, 1979b, 1983, Elling *et al.*, 1985].

Dans des cas d'exposition prolongée à de faibles concentrations d'OTA dans l'aliment, de l'ordre d'1 ppm, les signes cliniques associés à l'atteinte rénale sont subtils surtout si la boisson est distribuée automatiquement et si les animaux sont élevés sur caillebotis. Souvent, la seule indication d'ochratoxicose est donnée à l'abattoir avec des reins pâles, fermes et fibrosés [Cook *et al.* , 1986].

- **Forme aiguë :**

La consommation d'aliments fortement contaminés par l'OTA entraîne des formes d'ochratoxicoses sévères.

Le tableau clinique est varié : pour des concentrations en OTA de 1 à 2 mg par kilo de poids vif, des truies adultes ont développé une atteinte digestive exprimée par une anorexie totale, de la diarrhée, une déshydratation marquée, de l'hématémèse, des nausées et du ténésme [Szczech *et al.*, 1973].

Les morts sont occasionnelles et précédées de dépressions et d'abattement de quelques jours [Cook *et al.*, 1986].

L'état général des animaux est, dans certains cas, aggravé par la fièvre [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Mais les effets extrarénaux de l'OTA ne se limitent pas au tube digestif, ainsi de jeunes porcelets de 3 à 4 semaines exposés à de concentrations en OTA supérieures à 5 ppm dans les aliments ont présenté une atteinte du foie, de la rate et des tissus lymphoïdes.

De nombreuses manifestations cliniques suggèrent une diminution des capacités de défense : les porcelets sont parfois atteints d'une conjonctivite bilatérale, de tonsillite... Ces éléments ont conduit à l'étude des effets immunosuppresseurs de l'OTA.

In vitro, le test de stimulation des lymphocytes a été utilisé pour élucider l'effet immunosuppresseur de l'OTA sur des lymphocytes prélevés sur des porcs de trois mois. L'addition de faibles concentrations d'OTA (inférieures à 1 mg par litre) entraîne une inhibition de la lymphoblastogénèse mesurée par l'incorporation de thymidine triciée dans les cellules. L'OTA aurait donc la capacité d'inhiber la réponse immunitaire à médiation cellulaire [Holmberg *et al.*, 1991].

Une autre étude visant à évaluer le pouvoir immunosuppresseur de l'OTA a été conduite en utilisant des porcs de trois mois cliniquement en bonne santé et indemnes de toute pathologie. Un groupe a été exposé à 0,2 ppm d'OTA pendant 63 jours dans l'alimentation, un deuxième groupe, à 0,7 ppm pendant 35 jours. Au terme de ces périodes, les animaux ont été vaccinés par le vaccin *Bordetella*. Les titres d'anticorps, après vaccination, des deux groupes d'animaux exposés à l'OTA n'étaient pas différents de ceux des animaux témoins [Holmberg *et al.* 1990a et 1990b].

Le tableau clinique de l'ochratoxicose pouvant être aggravé lors de contaminations multiples de l'aliment (Tableau 11), les effets des associations de mycotoxines ont été évalués. Un effet synergique a été observé lors de contamination conjointe avec l'aflatoxine [Holmberg *et al.*, 1990 a, 1990b].

De même, bien que l'OTA soit déterminante dans la néphropathie porcine, la présence simultanée de citrinine, qui a un mécanisme d'action similaire, produit une maladie plus sévère [Humphreys, 1988].

Enfin, le déoxynivalénol, la toxine T2 et l'acide pénicillique auraient également un effet aggravant [Creppy *et al.*, 1995].

Tableau 11 Effets de l'ochratoxine en association avec d'autres mycotoxines

Mycotoxine associée	Effets	Synergie	Référence
Aflatoxine B1	Mortalité accrue, déficit pondéral, hyperplasie du foie, néphropathie accentuée, carcinogénicité accrue.	oui	[94]
Citrinine	Cytotoxicité accrue, cancérogénicité accrue	oui	[34, 35]
Déoxynivalénol	Déficit pondéral accru, nette augmentation du poids de l'organe par rapport au poids du corps	oui	[119]
Acide pénicillique	Mortalité accrue, lésions tubulaires rénales augmentées	oui	[119]
T2-Toxine	Déficit pondéral, effet tératogène et immunosuppression accrue	oui	[119]

1-3-Diagnostic :

1.3.1.Clinique :

Les signes cliniques sont peu caractéristiques (polyuro-polydypsie, diminution de la croissance...). C'est pourquoi l'ochratoxicose du porc est souvent suspectée seulement à l'abattoir, avec des reins de taille anormalement élevée, pâles ou tachetés, marbrés facilement reconnaissables [Stoev *et al.*,1998 et Stoev, 2000] (cf.1.4.4.).

1.3.2.Biologique :

Biochimie :

L'administration de 1 ppm d'OTA à des porcs en croissance (45 à 90 kg) entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de créatinine et d'urée: la concentration plasmatique d'urée s'élevait à 7 mg/dl. La concentration plasmatique en protéines totales est également augmentée.

Les concentrations plasmatiques en bilirubine totale et en bilirubine directe sont au dessus des valeurs usuelles : bilirubine totale = 12 mg/dl et bilirubine directe = 8 mg/dl.

En revanche les concentrations plasmatiques en albumine, en sorbitol déshydrogénase et en aspartate transaminase sont normales [Cook *et al.*, 1986].

Analyse d'urine :

Les modifications de la composition de l'urine sont observées sur des porcs charcutiers exposés de façon chronique à des doses d'OTA dans l'alimentation comprises entre 0,5 et 1 ppm.

L'activité de la leucine aminopeptidase dans l'urine est augmentée.

L'atteinte du fonctionnement du tubule proximal est révélée par une diminution de la capacité du rein à concentrer les urines : la densité urinaire est faible (1,005) [Cook *et al.*, 1986]. Elle conduit également à une augmentation de l'excrétion urinaire de glucose [Humphreys, 1988].

Ce tableau est complété par une protéinurie, un pH alcalin de l'urine (pH = 8) notant une altération de la fonction tubulaire.

1.3.3. Lésionnel :

Examen macroscopique :

Des études conduites en 1993 et en 1994 sur les reins de 506 porcs à l'abattoir qui avaient des caractéristiques macroscopiques anormales ont conduit à un classement en cinq groupes :

- agrandis
- agrandis et pâles
- kystiques
- fibrotiques

L'analyse rétrospective d'échantillons d'aliments distribués dans les élevages d'origine des porcs atteints a montré des teneurs en OTA pouvant atteindre environ 0,5 ppm [Stoew *et al.*, 1998].

Lors de l'inspection, à l'abattoir, les reins des porcs touchés sont hypertrophiés, gris, pâles et enflés, ils souffrent d'une dégénérescence des tubules proximaux, qui, après une période d'exposition à l'OTA de 6 à 8 mois, à des concentrations en OTA inférieures à 0,5 ppm, peut évoluer en fibrose extensive, avec une atrophie glomérulaire sanctionnée à l'inspection des organes émonctoires.

En cas d'intoxication aiguë par l'OTA à 2 mg par kilo de poids vif, les organes atteints en plus du rein sont ictériques, les nœuds lymphatiques mésentériques sont oedémateux et hyperémiques, le foie est pâle et brun clair, des érosions focales de la muqueuse gastrique sont visibles, un matériel d'apparence gélatineux encombre le tractus urinaire et le bassinnet [Cook *et al.*, 1986].

Examen microscopique :

Lors d'intoxication chronique, les changements de l'épithélium tubulaire sont progressifs : on constate tout d'abord une fibrose périglomérulaire et interstitielle. L'interstitium est envahi par des fibres de collagène et certains tubules sont bouchés avec le cytoplasme des cellules épithéliales détruites, d'autres sont collabés et entourés de tissus fibreux [Cook *et al.*, 1986]. L'évolution peut aller jusqu'à une atrophie tubulaire, un épaissement des membranes basales, une sclérose, une fibrose et une hyalinisation glomérulaire [Humphrey, 1988, Hollinger & Ekperigin, 1999, Derache, R. & Derache, P., 1986].

L'étude histopathologique d'organes de truies mortes intoxiquées par des concentrations en OTA de 1 à 2 mg par kg de poids vif a mis en évidence une nécrose de l'épithélium tubulaire rénal, des débris de protéines et une dilatation tubulaire, surtout dans les tubules contournés proximaux et distaux.

En cas d'intoxication aiguë, les lésions sont aussi extrarénales, en plus de la nécrose des nœuds lymphatiques, la rate subit une déplétion lymphoïde dans le jéjunum et dans l'iléon, des érosions focales dues à la nécrose des cellules épithéliales marquent le sommet de nombreuses villosités [Szczecz *et al.*, 1973].

1.3.4. Diagnostic expérimental de certitude

Le diagnostic de certitude passe par le dosage de l'OTA dans différents tissus ou organes.

La présence d'OTA dans des échantillons de sang de porc ou dans des organes, à l'abattoir, a été recherchée.

En Suède, en 1978 et en 1983, Hult a étudié la prévalence de la contamination en OTA des porcs charcutiers :

Les résultats mettent en évidence l'importance de la contamination des porcs : près d'1/4 des animaux sont au moins faiblement contaminés, 5 à 7% ont plus de 5 ng d'OTA par ml de sang et 4 à 5%, plus de 10 ng par ml.

Ce degré de contamination se retrouve dans tous les pays du nord et de l'est de l'Europe.

En Belgique, une étude visant à évaluer la prévalence de l'OTA a été conduite de février 1986 à février 1987 [Rousseau & Van Peteghem, 1989].

Des reins de porc ont été sélectionnés, à l'abattoir sur la base des caractéristiques macroscopiques suivantes :

- reins pâles
- augmentation de la taille des reins
- tâches à la surface du rein
- fibrose corticale

A partir de ces critères de choix, on a procédé à l'analyse des résidus d'OTA dans les reins, le sérum et l'alimentation (Tableau 12).

Dans 82,3% des reins suspects, on n'a pas pu mettre en évidence de résidus d'OTA. Ce résultat s'explique par un changement alimentaire avant l'abattage ou par l'implication d'autres agents dans les lésions constatées.

Aux pertes économiques directes liées à l'ochratoxicose (retards de croissance, augmentation de l'indice de consommation...) s'ajoute le problème posé par la persistance de la mycotoxine et de ses métabolites dans les tissus destinés à la consommation humaine.

Tableau 12 : résidus dans les tissus de porc après une exposition orale à l'OTA

Exposition	Résidus dans les reins	Résidus dans le sérum	Références
<u>Mais</u> : 3.6 à 7.2 ng/g	0.8 à 1.6 ng/g	3.1 à 3.7 ng/ml	[202]
<u>Blé</u> : 4.6 à 5.8 ng/g	0.5 à 1.8 ng/g	2.3 à 3.7 ng/ml	[212]
<u>Aliment mélangé</u> : 38 à 552 ng/g	1.50 à 7.17 ng/g	27 à 249 ng/ml	[212]

1-4-Pronostic :

La néphropathie mycotoxique porcine classique est une atteinte rénale chronique se traduisant par une mortalité très faible en raison de l'espérance de vie très courte des porcs charcutiers, rapidement destinés à l'abattoir [Stoev, 1998].

On peut souligner qu'un changement alimentaire au profit de graines indemnes d'OTA assure la réversibilité des symptômes : la quantité d'eau bue redevient normale, la fréquence des mictions diminue...En 4 semaines les résidus d'OTA ne sont plus décelables dans les tissus des porcs [Stoev, 1998].

1-5-Traitement et prophylaxie:

Les stratégies de traitement proposées à l'heure actuelle ne sont pas adaptées aux systèmes d'élevage et au souci de rentabilité qui n'autorisent pas de thérapie individuelle.

La prévention des ochratoxicoses porcines passe donc par un contrôle strict de l'alimentation : il faut lutter contre le développement des moisissures pendant le stockage, et en cas d'approvisionnement à l'extérieur de l'exploitation, contrôler la teneur en OTA des grains et des produits dérivés.

Nous avons par ailleurs évoqué précédemment que les adsorbants utilisables en alimentation animale n'avaient qu'une faible activité vis à vis de ce contaminant.

Tableau 13 : Récapitulatif des manifestations d'une ochratoxicose chez le porc :

Signes	Manifestations	Dose, durée	Référence
Signes cliniques	<p><u>Intoxication chronique :</u> Polyuro-polydypsie Diminution de la croissance, de l'indice de conversion alimentaire, du gain de poids, de la consommation alimentaire</p> <p><u>Intoxication aiguë :</u> Anorexie, diarrhée, déshydratation Conjonctivite bilatérale, tonsillite Hématémèse, nausées, ténésme Dépression, abattement, fièvre, mort</p>	<p>1 ppm 2 ans</p> <p>5 ppm 5-7 jours</p>	<p>[100, 32]</p> <p>[226, 32] [101, 102, 103]</p>
Signes immunologiques	<i>In vivo</i> il n'y a pas de modification du titre en anticorps après vaccination par <i>bordetella</i>	<p>0,2 ppm pendant 63 jours 0.7 ppm pendant 35 jours</p>	<p>[101] [102]</p>
Signes biochimiques	Concentrations sériques d'urée et de créatinine augmentées Concentrations sériques de bilirubine totale et de bilirubine directe augmentées Concentrations sériques en sorbitol déshydrogénase et aspartate transaminase normales Concentrations sériques d'albumine et de transaminases diminuées	1 ppm	[32]
Signes urinaires	Augmentation de l'activité de la leucine aminopeptidase Diminution de la densité urinaire Glucosurie et protéinurie PH alcalin Altération de la fonction tubulaire	0,5 à 1 ppm chronique	[32, 110]
Signes anatomo-pathologiques	<p><u>Intoxication chronique :</u> Reins hypertrophiés, pâles, gris, enflés Fibrose extensive, atrophie glomérulaire</p> <p><u>Intoxication aiguë :</u> Organes ictériques Nœuds lymphatiques mésentériques oedémateux et hyperhémiques Foie brun clair Erosions focales de la muqueuse gastrique</p>	<p>0,5 ppm 6 à 8 mois</p> <p>5 ppm, 7jours</p>	<p>[32]</p> <p>[101, 102, 103]</p>
Signes histologiques	<p><u>Intoxication chronique :</u> Amincissement des membranes basales Hyalinisation glomérulaire Fibrose interstitielle et périglomérulaire</p> <p><u>Intoxication aiguë :</u> Nécrose des cellules tubulaires, des cellules épithéliales du jéjunum et de l'iléon</p>	<p>1 ppm chronique</p> <p>5-10 ppm</p>	<p>[100]</p> <p>[110, 226]</p>

N.B.En ppm : la concentration en OTA des aliments suivie de la durée de l'exposition

2-LES VOLAILLES

2-1-Présentation :

L'OTA peut également avoir une forte toxicité chez les Volailles, la mortalité pouvant atteindre 55%. Les atteintes majeures sont rénales, mais l'état général des volailles est aussi largement affecté [Hamilton *et al.*, 1982].

Les niveaux toxiques minimum pour les volailles sont voisins de 0,5 mg/kg d'aliment chez les poules pondeuses et les poulets de chair [Huff *et al.*, 1978].

Neuf épisodes d'ochratoxicose ont été recensés en 1982, aux USA, par Hamilton [Hamilton *et al.*, 1982]: les lots de dindes, poules pondeuses et poulets de chair affectés, comptant entre 20 000 et 1 200 000 animaux étaient contaminés par des niveaux d'OTA dans l'alimentation allant de 0,3 à 16 ppm.

Pourtant, d'après Osweiler et Galey, en 2000, les laboratoires de diagnostic vétérinaire aux Etats Unis et au Canada rapportent rarement cette mycotoxicose [Osweiler & Galey, 2000].

2-2-Symptômes:

Comme on l'a vu pour les porcs, le tableau clinique est fonction de la concentration en OTA ingérée par les animaux et de la durée de l'exposition. Nous nous intéresserons d'abord à la forme « chronique » due à une exposition à de faibles concentrations de mycotoxine sur des périodes relativement longues, puis nous envisagerons la symptomatologie des formes « aiguës » dues à une intoxication par des concentrations plus importantes d'OTA. En dernier lieu nous développerons les particularités symptomatiques inhérentes à chaque espèce d'oiseau.

2.2.1.forme chronique :

A des concentrations en OTA dans l'aliment de 0,3 ppm à 1 ppm, les poulets, les dindons etc. intoxiqués souffrent d'un retard de croissance. A un niveau de contamination de 2 ppm dans l'aliment, il y a une diminution de la croissance à partir de 12-18 jours, à 4 ppm, dès 6 jours [Huff *et al.*, 1988]. La diminution du poids corporel est aggravée par de mauvais indices de conversion alimentaire [Hamilton *et al.*,1982, Dwivedi & Burns, 1984d].

A ces mêmes concentrations, on peut noter un retard dans l'atteinte de la maturité sexuelle et des modifications de la conformation de jeunes oiseaux en croissance [Huff *et al.*, 1988].

Les poids relatifs du foie, du rein, de la rate, du pancréas et du gésier sont augmentés pour 4 ppm d'OTA dans l'aliment, au bout de 21 jours. Dans ces études, le gésier semble le premier organe atteint, puis le rein, le pancréas, la rate et enfin le foie. Il n'y a pas de modification du poids de la bourse de Fabricius ni du proventricule. La sensibilité du gésier serait due à l'effet irritant et érosif du contact direct de la mycotoxine sur le haut appareil gastrointestinal. Le proventricule apparaît comme étant beaucoup moins sensible, ceci est probablement dû aux différences de concentration en OTA dans le gésier et dans le proventricule [Huff *et al.*, 1988].

Des poussins intoxiqués par l'OTA à 1 ppm présentent une augmentation de la filtration glomérulaire (2,5ml/min/kg de poids vif chez les animaux traités contre 2,3ml/min/kg chez les témoins) [Doerr & Reed, 1984]. La polyuro-polydypsie est révélée cliniquement par un large volume de fécès humides [Elling *et al.*, 1975].

Toutes les espèces d'oiseaux exposées à l'OTA à des concentrations de 2 ppm développent une néphropathie [Dwivedi *et al.*, 1984a et 1984c, Kubena *et al.*, 1985, Hamilton *et al.*, 1982].

Comme chez le porc, les effets immunotoxiques de l'OTA ont été explorés chez les volailles. La mycotoxine entraîne [Hollinger & Ekperigin, 1999] une déplétion en cellules lymphoïdes, une diminution des cellules souches de la moelle osseuse et des cellules Natural Killer. Les monocytes et les polynucléaires neutrophiles perdent leurs capacités phagocytaires. L'OTA entraîne une diminution du contenu en immunoglobulines de tous les organes lymphoïdes étudiés [Humphreys, 1988].

La diminution des défenses immunitaires est mise en évidence sur des poulets de chair de 2 mois exposés à des concentrations en OTA dans l'aliment de 0,4 à 1,5 ppm : la sensibilité des poulets aux Salmonelles est augmentée [Hollinger & Ekperigin, 1999], il en est de même pour les aérosacculites dues à E.coli (qui ne répondent pas tout de suite à l'antibiothérapie) et les infections respiratoires non spécifiques [Hamilton *et al.*, 1982].

2.2.2. forme aiguë :

La DL50 pour les poulets est de 3,4 mg/kg de poids vif. Elle est de 5,9 pour les dindes et de 16,5 pour les cailles [Dwivedi & Burns, 1984d].

Pour des concentrations en OTA variant de 2 à 16 ppm dans l'aliment, les oiseaux sont prostrés, ataxiques avec des tremblements et une diminution des réflexes [Bryden, 1998].

En 1983, en Italie, des poulets, des lapins et des chiens ayant consommé un aliment très contaminé par l'OTA ont développé une gastro-entérite létale : le pain moisi responsable des intoxications était contaminé à un niveau record : 80 ppm d'OTA et 9,6 ppm d'OTB. En 1984, en Ukraine, un élevage de canards a perdu 42% de son effectif après 2 à 6 jours de maladie. Les oiseaux affectés avaient des hémorragies dans différents tissus, une gastrite et une entérite catarrhales. Un aliment très contaminé par *Aspergillus ochraceus* et par l'OTA était en cause [Bryden, 1998].

En outre, l'OTA favorise les lésions de l'intestin large en diminuant sa résistance à l'extension [Huff *et al.*, 1988].

2.2.3. Effet de l'OTA sur la fertilité et la viabilité embryonnaire :

Des cailles du Japon mâles et femelles ont été exposées pendant 9 semaines à 0 ou 16 ppm d'OTA, l'effet de l'OTA sur les gamètes mâles a été évalué : elle n'a pas d'influence sur la spermatogénèse, par contre les œufs issus de femelles exposées à 16 ppm d'OTA ont montré un taux de mortalité embryonnaire précoce élevé.

Dans la même étude, des œufs fertiles ont reçu 1600 ou 5000 ng d'OTA, puis ont été mis quotidiennement à l'incubateur, pendant 7 jours, un taux de mortalité embryonnaire précoce élevé a, là aussi, été observé [Prior *et al.*, 1979].

2.2.4. Particularités symptomatiques :

2.2.4.1 Dindons :

La différence symptomatologique majeure déterminée entre les poulets et les dindons réside dans le refus alimentaire : celui ci a été observé chez les dindes mais pas chez les poulets.

Dans le cadre d'une étude expérimentale, le refus alimentaire s'est élevé à 50%, chez les dindes lorsque l'alimentation était contaminée à 16 ppm d'OTA, par contre, chez les poulets, pour des concentrations en OTA de l'alimentation variant de 0 à 15 ppm, il n'y pas eu de modification de la prise alimentaire, ainsi le refus alimentaire ne peut entrer dans un cadre diagnostique que chez les dindes [Burditt *et al.*,1984].

Une autre étude portant sur cinq épisodes d'ochratoxicose chez la dinde, dans des conditions d'élevage a montré que le premier symptôme observé est une diminution de la consommation alimentaire de plus de la moitié, puis on a une anorexie totale et une mortalité importante 2 ou 3 jours après. Chez les survivants on a une pauvre conversion alimentaire, un faible taux de croissance, un manque d'uniformité des carcasses, les oiseaux contaminés paraissent plus allongés que les oiseaux indemnes [Hamilton *et al.*,1982]. Une diminution du poids de 0,5 kg des dindons est enregistrée à l'abattage [Hamilton *et al.*,1982]. Une analyse *a posteriori* des aliments a montré un niveau de contamination en OTA de l'ordre de 8 ppm, en revanche il n'y avait pas trace de pesticides, de métaux lourds, de biphenyls polychlorinés, de F2 toxine , de T2 toxine ou d'aflatoxine, par contre la présence de DON n'a pas été recherchée.

2.2.4.2.Poulets de chair :

Dans cette espèce, le retard de croissance est un signe précoce d'ochratoxicose, il est associé à une diminution du poids et des performances : sur des poulets de 2 mois exposés à des concentrations en OTA dans l'alimentation de 0,5 à 2 ppm, le ratio de conversion alimentaire est passé de 1,91 à 1,96 ; le poids moyen des animaux intoxiqués était de 1,74 kg au lieu de 1,86 kg pour les oiseaux témoins [Hamilton *et al.*, 1982].

L'OTA entraîne aussi une dépigmentation des poulets [Dwivedi *et al.*, 1984a] et une diminution de la solidité des os à 2 ppm [Hamilton *et al.*, 1982, Huff, 1977, Dwivedi *et al.*, 1984a].

2.2.4.3 Poules pondeuses :

Diminution de la production d'œufs :

L'administration de 0.3 à 4 ppm d'OTA entraîne une diminution de la production d'œufs de 0,71 à 0,64 œuf/jour. Le retour à la normale, après un changement d'aliment est rapide (2

semaines) [Prior & Sisodia, 1978]. Le refus alimentaire n'est pas la cause de la chute de ponte [Bryden, 1998].

Modification des œufs :

De 0.5 à 1 ppm, il y a une réduction de la gravité spécifique des œufs, les coquilles sont minces et molles, les bris de coquilles s'élèvent à 6% au lieu de 4%.

Il faut noter un nombre excessif de tâches sur les coquilles d'œufs produits : 35 à 40% des œufs ont de discrètes tâches jaunes qui ne partent pas à l'eau lorsque l'alimentation des poules pondeuses est contaminé à 0,5 ppm d'OTA, ce qui entraîne leur dépréciation sur le marché [Page *et al.*, 1980].

La surface des œufs est altérée par l'adhérence de débris à la coquille due à sa consistance modifiée et à la rétention d'urine dans le cloaque [Hollinger & Ekperigin, 1999].

2-3-Diagnostic :

2.3.1.Diagnostic Clinique

La symptomatologie décrite ci-dessus n'est souvent pas suffisante pour établir un diagnostic de certitude car les signes cliniques ne sont pas pathognomoniques, le diagnostic doit donc s'appuyer sur des analyses biologiques complémentaires et sur la mise en évidence de résidus d'OTA dans les tissus.

2.3.2.Diagnostic Biochimique

Les concentrations sériques en protéines totales et en albumine sont inférieures à la normale. La concentration sérique en protéines totales est de 1,57 g/100 ml pour des poulets ayant reçu 4 ppm d'OTA dans l'alimentation et de 2,8 g/100 ml pour les animaux témoins (la concentration sérique en albumine est de 0,63 g/100 ml au lieu de 1.3 g/100 ml). Ces paramètres biochimiques semblent les plus sensibles parmi ceux mesurés (acide urique, urée, créatinine, glucose, triglycérides, cholestérol...) [Huff *et al.*, 1988].

La diminution des concentrations en protéines sériques est sans doute liée à la fois à une inhibition de la synthèse hépatique des protéines (cf. Partie 3) et à une perte rénale due aux lésions induites par l'OTA.

Les concentrations sériques en cholestérol et en triglycérides diminuent (mais la diminution de la concentration sérique en triglycérides est tardive). Les poulets nourris avec des aliments contaminés à 4 ppm d'OTA ont une concentration sérique en cholestérol de 75 mg/100 ml, alors que la concentration sérique moyenne des animaux témoins est 144 mg/100 ml. Dans les mêmes conditions, la concentration sérique en triglycérides est de 85 mg/100 ml au lieu de 131 mg/100 ml [Huff *et al.*, 1988].

La diminution du cholestérol, des triglycérides et du NH₃ est probablement la conséquence des effets hépatotoxiques de l'OTA [Huff *et al.*, 1988].

Les concentrations en acide urique et en créatinine augmentent, ce qui est un reflet des dommages rénaux induits par l'OTA. L'augmentation en acide urique serait un indicateur assez sensible d'ochratoxicose chez les volailles. L'administration de 0,5 ppm d'OTA dans l'alimentation entraîne une augmentation d'acide urique de 2,85% par rapport aux témoins ; pour 1 ppm, l'augmentation est de 17,39% [Page *et al.*, 1980].

Il faut également souligner que les concentrations sériques en calcium, en phosphates inorganiques, en caroténoïdes et en potassium diminuent [Hollinger & Ekperigin, 1999].

En ce qui concerne les modifications enzymatiques, l'activité de la gamma glutamyl transférase augmente, il en est de même pour la cholinestérase et les phosphatases sériques [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Ainsi pour de jeunes poulets de 21 jours, la concentration de la gamma glutamyl transférase est de 9,6 UI/l pour le groupe exposé à 4 ppm d'OTA dans l'alimentation au lieu de 7,7 UI/l dans le groupe témoin [Huff *et al.*, 1978]. La signification de ces modifications est difficile à évaluer dans la mesure où ces valeurs restent comprises dans les intervalles usuels.

En revanche les activités de la glutamique oxalacétique transaminase, de la créatine kinase, de la lactate déshydrogénase ne connaissent pas de changements significatifs.

2.3.3. Diagnostic Hématologique

A la concentration de 4 ppm d'OTA dans l'alimentation la concentration en hémoglobine diminue de 8,7 g/100 ml de sérum à 7,2 g/100 ml chez le poulet de 21 jours [Huff *et al.*, 1988]. A une concentration de 8 ppm d'OTA dans l'alimentation, il n'y a pas d'effet sur le nombre d'érythrocytes, mais le volume érythrocytaire moyen et la concentration en hémoglobine diminuent significativement : l'anémie est hypochrome, microcytaire et ferriprive à cause de l'inhibition de l'absorption de fer combinée à une suppression de l'hématopoïèse [Huff *et al.*, 1988].

A cela s'ajoute une leucopénie, à 0,5 ppm, causée par une diminution dramatique en lymphocytes. Le nombre de lymphocytes de cailles exposées à 4 ppm d'OTA dans l'alimentation passe de 8689 à 4852 [Sujani & Sriraman, 2000].

Une telle lymphopénie est rare et pourrait être un indicateur utile de l'ochratoxicose [Huff *et al.*, 1977].

L'ochratoxine aggrave l'évolution des blessures à travers l'atteinte de la coagulation [Huff *et al.*, 1978].

2.3.4. Diagnostic Lésionnel

Examen macroscopique :

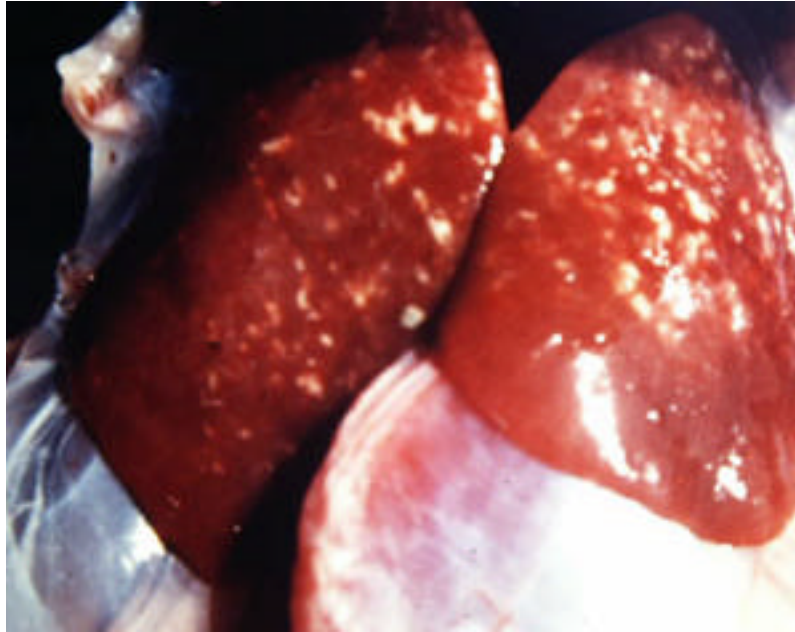
A 4 ppm d'OTA dans les aliments, l'autopsie des volailles montre que 90% des reins sont bruns pâles au lieu d'une couleur acajou normale [Hamilton *et al.*, 1982].

L'examen macroscopique des organes de poulets de chair de 20 jours exposés à des concentrations de 2 à 4 ppm d'OTA dans l'alimentation montre une néphrose sévère, avec une accumulation d'urates dans les tubules et les uretères, et sur le mésentère de l'abdomen et des organes abdominaux. L'atrophie des reins est uni ou bilatérale [Dwivedi *et al.*, 1984c, Page *et al.*, 1980, Hollinger & Ekperigin, 1999].

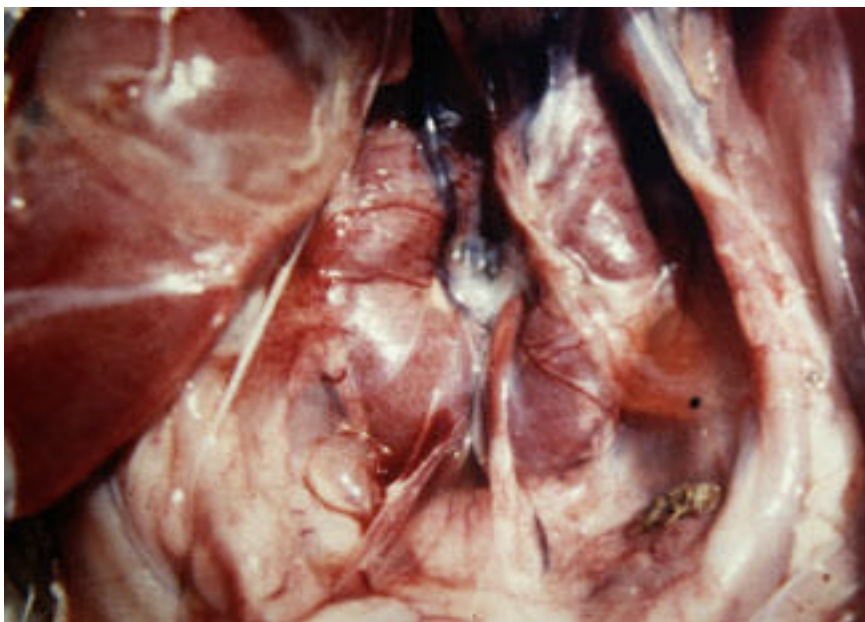
En cas d'ochratoxicose aiguë (ayant entraîné la mort des animaux), les reins sont pâles, gonflés, hémorragiques chez les poulets de chair, les dindons et les poules pondeuses [Hamilton *et al.*, 1982]. Le foie est pâle également. Sur le reste de la carcasse, on peut remarquer une hypertrophie des nœuds lymphatiques et une congestion intestinale.

La bile est plus claire et moins visqueuse. Chez certains oiseaux, une légère entérite catarrhale peut être mise en évidence.

Les poids relatifs du pancréas et du gésier sont augmentés. Des études rétrospectives ont montré une contamination des aliments en OTA variant de 5 à 16 ppm [Hamilton *et al.*, 1982].



Photographie 11 Foie de poulet fibrosé avec des foyers de nécrose [244]



Photographie 12 Reins de poulet hypertrophiés [244]

Examen microscopique :

Lors d' exposition à des concentrations en OTA de 0,5 à 1 ppm d'aliment, il y a une atrophie et une dégénérescence des tubules proximaux et distaux [Hollinger & Ekperigin, 1999]. Le

tube contourné proximal est le plus atteint, il présente une distension sévère, un élargissement et une hypertrophie, un épaississement des membranes basales des glomérules avec, dans certains cas, de faibles accumulations de glycogène dans le cytoplasme [Burns & Maxwell, 1987]. Le cytoplasme de l'épithélium tubulaire est granuleux, il y a une hyperplasie des cellules.

Dans le foie, pour 4 à 8 ppm, on voit une vacuolisation et une accumulation de glycogène dans les hépatocytes avec, parfois, une nécrose focale des hépatocytes [Maxwell & Burns, 1987]. L'accumulation de glycogène intéresse tout le tissu hépatique mais plus particulièrement la périphérie des lobules. On trouve des mitochondries en forme d'anneaux à 5 ppm [Burns & Maxwell, 1987]. Les modifications dans le foie varient d'une légère dégénérescence à une vacuolisation des hépatocytes. Le contenu en glycogène du foie est augmenté, le contenu lipidique demeure inaltéré [Bryden, 1998]. La régression et la réduction de la population de cellules lymphoïdes dans les organes immuns sont marquées.

2.3.5. Diagnostic Expérimental

Des teneurs de 29 µg d'OTA par kg ont été retrouvées dans des conditions de contamination naturelle (niveaux non précisés) [Weidenburner, 2001]. En général, le foie et les reins contiennent la majorité des résidus. Des teneurs de 9 à 18 ppb sont rencontrées dans des reins de poules recevant 5,2 ppm d'OTA [Bauer *et al.*, 1988].

Les résidus d'OTA disparaissent des muscles blancs et rouges 24H après l'arrêt de l'alimentation mais persistent plus de 48H dans le foie et le rein [Prior & Sisodia, 1978].

A des doses de 0,5 à 4 ppm dans l'alimentation, on ne retrouve pas de résidus dans la peau et la graisse (cf. Tableau 14).

Les résidus sont totalement éliminés après 5 à 7 jours [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Tableau 14 Résidus dans les tissus de volailles après une exposition orale à l'OTA

Niveau de contamination de l'alimentation (ppm)	Résidus (ppm) après 6 semaines de traitement					
	foie	rein	Muscle blanc	Muscle rouge	graisse	peau
0	0	0	0	0	0	0
0.5	26.3	36.8	0	8.0	0	0
1.0	57.6	77.0	4.6	12.6	0	ND
4.0	72.6	106.9	15.9	20.8	0	ND

Après 24 heures d'arrêt du traitement.

4.0	26.3	31.0	0	ND	0	0
-----	------	------	---	----	---	---

Après 48 heures d'arrêt du traitement.

4.0	8.7	13.1	0	ND	0	0
-----	-----	------	---	----	---	---

2-4-Traitement et Prophylaxie :

Comme chez le porc, la prévention de l'ochratoxicose est l'approche la plus efficace. Une supplémentation des rations en vitamine E semble par ailleurs avoir un effet bénéfique [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Tableau 15 Récapitulatif des manifestations d'une ochratoxicose chez les Volailles:

Manifestations	Dose/durée	Références
<p>Signes cliniques</p> <p><i>Intoxication chronique :</i> Retard de croissance, diminution du PC, faible GMQ</p> <p>Refus alimentaire Polyuro-Polydypsie</p> <p>Diminution de la production d'œufs</p> <p>Mortalité embryonnaire précoce Œufs fragilisés, altérés</p> <p><i>Intoxication aiguë :</i> Tremblements, pertes de réflexes, prostration, ataxie Gastro-entérites catarrhales</p>	<p>1 à 2 ppm chronique 8 ppm</p> <p>0.3 à 4 ppm</p> <p>16 ppm, 9 semaines 0,3 à 4 ppm, 6 semaines</p> <p>3 à 16 ppm, quelques jours</p>	<p>[53, 56, 88, 89, 49] [22] [88, 89, 107, 138] [195]</p> <p>[195, 174, 100]</p> <p>[195, 21, 23]</p>
<p>Signes immunologiques</p> <p>Déplétion en cellules lymphoïdes, diminution des cellules souches de la moelle osseuse, diminution du nombre de cellules Natural Killer</p> <p>Pertes des capacités phagocytaires et locomotrices des lymphocytes.</p> <p>Augmentation de la sensibilité aux Salmonelles, aux aérosacculites, aux infections respiratoires non spécifiques.</p>	<p>0,4 à 1,5 ppm, chronique</p>	<p>[110]</p> <p>[100] [89]</p>
<p>Signes biochimiques</p> <p>Concentrations sériques en créatinine et en acide urique augmentées</p> <p>Concentrations sériques en albumine, protéines totales, cholestérol et triglycérides diminuées</p> <p>Concentrations sériques en calcium, potassium, phosphore et caroténoïdes diminuées</p> <p>Augmentation des activités de la gamma-glutamyltransférase, de la cholinestérase, des phosphatases sériques</p>	<p>2 à 4 ppm</p> <p>4 ppm</p>	<p>[106]</p> <p>[176]</p> <p>[100]</p> <p>[100, 106]</p>
<p>Signes hématologiques</p> <p>Anémie hypochrome, microcytaire, ferriprive</p> <p>Leucopénie</p> <p>Lymphopénie</p>	<p>4 à 8 ppm</p> <p>0,5 ppm 4 ppm</p>	<p>[106]</p> <p>[223]</p>
<p>Signes anatomo-pathologiques</p> <p><i>Intoxication chronique :</i> Augmentation du poids relatif du foie, du rein, de la rate, du pancréas et du gésier</p> <p>Dépigmentation des carcasses</p> <p>Diminution de la force des os</p> <p><i>Intoxication aiguë :</i> Reins pâles, hypertrophiés, hémorragiques</p> <p>Foie pâle, hypertrophie des nœuds lymphatiques, Congestion intestinale</p>	<p>4 ppm, 21 jours</p> <p>4 ppm 2 ppm, chronique</p> <p>16 ppm, quelques jours</p>	<p>[107]</p> <p>[56] [105]</p> <p>[89, 176]</p>
<p>Signes histologiques</p> <p>Atrophie et dégénérescence des tubules proximaux</p> <p>Accumulation de glycogène dans les hépatocytes, Vacuolisation des hépatocytes</p>	<p>0,5 à 1 ppm, 2 mois</p>	<p>[100, 23]</p>

3-LES RUMINANTS

Les ruminants semblent plus résistants que les autres espèces aux effets de la toxine car celle-ci est dégradée par la microflore ruminale [Ozpinara *et al.*, 1999]. Ainsi les ruminants n'expriment pas l'ochratoxicose à moins d'être exposés à de très hauts niveaux d'OTA, auquel cas le tableau clinique est marqué par une urémie, des hépatites, des ulcères gastrointestinaux et des pneumonies [Humphreys, 1988].

Des vaches ayant reçu 0,2 à 1,66 mg/kg de poids vif d'OTA pendant 4 jours n'ont pas montré de signes cliniques. Une vache ayant reçu 13,3 mg/kg de poids vif d'OTA a présenté de la diarrhée, de l'anorexie et une chute de sa production laitière un jour après l'administration [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Ainsi les concentrations en OTA présentes communément dans les aliments contaminés ne représentent pas un risque majeur pour la santé des bovins [Weidenburner, 2001].

Il a été estimé que l'administration d'au moins 1,66 mg d'OTA /kg de poids vif pendant 4 jours est nécessaire pour détecter des résidus d'OTA dans le lait. Les résultats concernant l'excrétion lactée de l'OTA par les ruminants ne sont pas unanimes.

Une étude sur 3 groupes de 4 moutons nourris pendant 4 semaines avec 0, 2 ou 5 ppm d'OTA révèle la présence d'OTA dans le sérum dès l'administration de 2 ppm. Ce résultat signifie que l'OTA n'a pas été dégradée par les microorganismes ruminiaux et intestinaux. L'analyse des fèces et de l'urine a corroboré cette découverte. Ainsi, l'hydrolyse de l'OTA dans le tractus gastrointestinal des moutons est nettement moins importante que ce qu'on pensait, surtout quand l'OTA est ingérée avec des régimes riches en concentrés [Höhler *et al.*, 1999].

4-LE CHIEN

Chez les carnivores, l'ochratoxicose peut faire suite à l'ingestion accidentelle de produits contaminés destinés à l'alimentation des animaux ou après ingestion de viande ou d'abats de porcs ou de volailles contenant des résidus d'ochratoxine.

Les atteintes spontanées sont très rarement décrites dans la littérature et sont plutôt des accidents exceptionnels.

Expérimentalement, des jeunes beagles mâles ont reçu, quotidiennement et par voie orale, 0,3 mg d'OTA par kg de poids vif pendant 11 à 12 jours. Le tableau clinique de l'ochratoxicose

expérimentale du chien est marqué par de l'anorexie, des vomissements, une perte de poids pouvant évoluer vers la prostration et la mort.

Les examens biologiques complémentaires montrent une augmentation de l'activité de l'aspartate aminotransférase et de la lactate déshydrogénase dans l'urine, une diminution de la densité urinaire, une protéinurie et une glucosurie. En outre, une augmentation des concentrations urinaires en lactate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase, leucine aminopeptidase, alanine et aspartate aminotransférases, et phosphatase alcaline est relevée.

Les examens anatomo-pathologique et histologique mettent en évidence une vacuolisation du cytoplasme et la formation de figures de myéline (correspondant à un désordre dans le système endomembranaire) dans les cellules tubulaires rénales épithéliales [Szczzech *et al.*, 1974].

Une nécrose hépatique centrolobulaire modérée et une atteinte des cellules graisseuses sont constatées [Humphreys, 1988]. Une nécrose des tissus lymphoïdes du thymus et des amygdales a également été notée [Kitchen *et al.* , 1977a, 1977b et 1977c].

5- L'HOMME :

5-1-Présentation :

Il y a des similitudes frappantes entre les changements dans la structure et la fonction rénale induits expérimentalement chez les animaux par l'administration d'OTA [Krogh *et al.*, 1974] (Tableau 16), et les symptômes et lésions d'une maladie endémique humaine connue sous le nom « néphropathie endémique des Balkans » [EHC 105].

Tableau 16 Similitudes entre la néphropathie porcine induite par l'OTA et la néphropathie endémique des Balkans :[Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999b]

Fonction rénale	altération de la fonction des tubules proximaux (Le transport maximum de l'acide para-aminohippurique diminue) altération, par la suite, de la fonction glomérulaire (La clairance de l'insuline diminue)
Atteinte du rein	atrophie des tubules hyalinisation des glomérules fibrose interstitielle
Epidémiologie	endémique distribution dépendant du sexe

Cette maladie est associée avec une augmentation de l'incidence de tumeurs du haut appareil urinaire.

Cependant, des concentrations en OTA comparables ont été trouvées dans quelques pays européens où la maladie n'est pas observée.

Les bases épidémiologiques et cliniques, disponibles ne suffisent pas pour calculer le potentiel carcinogénique chez les humains, et d'autres agents néphrotoxiques sont peut être impliqués dans la NEB [Creppy *et al.*, 1995].

L'OTA est toutefois considérée comme un cancérogène potentiel pour l'homme, et sa mesure dans le sang constitue une mesure d'exposition [Creppy *et al.*, 1995].

Variations des concentrations sanguines en OTA :

Une variabilité saisonnière de la contamination a été observée dans des échantillons de sang humain collectés en Allemagne et au Canada. Un plus grand nombre d'échantillons positifs a été recensé en été.

De même, les résultats d'une étude conduite en Croatie montrent que la contamination peut varier dans le temps et dans l'espace. Ainsi la prise quotidienne d'OTA dans l'alimentation est estimée à 0,5 ppb en mars et en juin mais n'est plus que de 0,25 en décembre (Tableau 17). Dans un village croate, Osijek, situé en dehors de la zone endémique, les concentrations sanguines en OTA sont plus élevées en été et s'élèvent à 0,75 ppb dans cette agglomération. Dans cette région, les habitudes alimentaires diffèrent du reste de la Croatie : les habitants consomment moins de fruits et de légumes et plus de céréales et de porc (Tableaux 17 et 18) [Peraica *et al.*, 2001].

Une autre étude réalisée en Italie (Tuscanie) souligne la forte association entre la saison et la fréquence des échantillons positifs. Des différences de niveau de contamination entre les différentes régions ont été relevées au Canada, en France, en Suède, en Suisse et en Tunisie. En revanche, une étude conduite au Danemark sur 144 échantillons de sang humain collectés de Janvier 1986 à Décembre 1989 a montré des variations de la concentration moyennes en OTA négligeables [Peraica *et al.*, 2001].

En Europe, la concentration moyenne d'OTA dans le sang est estimée à 0,90 ng/ml.

En France et en Suède, les différences de contamination interrégionales sont probablement dues à la consommation de céréales produites localement.

En Tunisie, la contamination est corrélée avec l'humidité et avec le stockage traditionnel des aliments.

Certaines habitudes alimentaires comme la consommation de vin, de bière et de café augmentent significativement l'exposition à l'OTA, et entraînent une différence dans le degré de contamination des hommes et des femmes. Dans les Alpes italiennes et allemandes, les hommes sont plus souvent contaminés que les femmes. Pourtant au Canada, en Hongrie, au Japon et en Suède, la présence de résidus d'OTA dans le sang n'est pas liée au sexe.

Tableau 17 Concentrations en OTA dans des échantillons de plasma humain collectés sur une période d'un an [Peraica *et al.*, 2001]

Période de collecte	Nombre d'échantillons	Ochratoxine A (ng/ml)				Concentration moyenne	Estimation de la prise journalière (ng/kg PC/j)
		0.2	0.2-1.0	1.0			
mars	242	112	109	21	0.36	0.48	
juin	249	101	135	13	0.39	0.52	
septembre	242	141	94	7	0.25	0.34	
décembre	250	161	85	4	0.19	0.25	
TOTAL	983	515	423	45	0.30	0.40	

Tableau 18 Concentrations en OTA dans des échantillons de plasma humain collectés dans 5 villes croates [Peraica *et al.*, 2001]

Ville	Nombre d'échantillons	Ochratoxine A (ng/ml)				Concentration moyenne	Estimation de la prise journalière (ng/kg PC/j)
		0.2	0.2-1.0	1.0			
Osijek	196	37	131	28	0.56	0.75	
Rijeka	198	153	45	0	0.13	0.17	
Split	191	96	86	9	0.31	0.42	
VaraZdin	200	119	75	6	0.31	0.42	
Zagreb	198	110	86	2	0.19	0.25	
TOTAL	983	515	423	45	0.30	0.40	

5-2-Symptômes et Lésions de la NEB:

L'évolution de la pathologie est lente et souvent asymptomatique. Elle conduit à une atrophie rénale sévère voire à des tumeurs du tractus urinaire chez l'homme [Bordas *et al.*, 1973, Chernozemsky *et al.*, 1977]. Aucun cas d'intoxication aiguë n'a été rapporté [Bordas *et al.*, 1973, Chernozemsky *et al.*, 1977].

Signes cliniques et biologiques :

La néphropathie endémique des Balkans (NEB) est caractérisée par une tubulonéphrite interstitielle avec enzymurie.

L'analyse d'urine révèle une protéinurie souvent minime (0,15 à 0,5 g/24h) composée majoritairement par des protéines de faible poids moléculaire (il s'agit souvent de \hat{a} -microglobulinurie), une glycosurie, une leucocyturie amicrobienne (20 à 250 leucocytes/mm³) [Kuramochi *et al.*, 1997]. Les transports anioniques de la bordure en brosse et de la membrane basolatérale des cellules tubulaires rénales sont altérés [Kane *et al.*, 1986, Sokol *et al.*, 1988]. Cette altération conduit à une élévation du pH urinaire due à l'augmentation des ions bicarbonates par inhibition de la réabsorption. Lorsque l'adaptation glomérulo-tubulaire ne se fait plus, une rétention de sodium s'effectue.

On note également une diminution de la filtration glomérulaire due à une baisse du flux plasmatique rénal et une augmentation de la résistance vasculaire. Ceci serait dû à un effet sur l'angiotensine II [Gekle *et al.*, 1993a, 1993b].

L'analyse sanguine révèle une augmentation de la gamma-glutamyl transférase, de la phosphatase alcaline, de la lactate déshydrogénase (qui diminuent parallèlement dans le néphron) [Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999b]; une acidose hyperchlorémique.

Les IgM et les IgG plasmatiques augmentent.

L'autopsie de personnes décédées de NEB révèle une dégénérescence des tubules proximaux, une atrophie de l'épithélium tubulaire, une fibrose interstitielle du cortex rénal, une hyalinisation des glomérules [Chernozemsky *et al.*, 1977, 39, Sokol *et al.*, 1988].

Des études *in vivo* sur des cultures de cellules humaines montrent que les effets de l'OTA à faible dose (inférieure ou égale à 10⁻⁶ mol/l) sur les cellules du tube proximal sont différents de ceux observés sur les cellules du canal collecteur (Tableau 19). En revanche, l'OTA à forte dose (supérieure à 10⁻⁶ mol/l) engendre les mêmes effets sur les deux types cellulaires [Gekle *et al.*, 1998].

Tableau 19 Effets de l'OTA sur les cellules du tubule proximal et celles du canal collecteur [Gekle *et al.*, 1998, Benezic *et al.*, 2000].

OTA	Tubule proximal	Canal collecteur
<10 ⁻⁶ mol/l	Inhibition non compétitive du transport d'anions organiques Inhibition du transport de cations organiques Prolifération cellulaire et hypertrophie Diminution de la réabsorption de protéines	Blocage des canaux anioniques et de l'échangeur Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ de la membrane plasmique Altérations de l'homéostasie Cl ⁻ et du pH cellulaire et du transport d'électrolytes et transépithélial H ⁺ Activation des protéines kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK 1/2) Dédifférenciation cellulaire
>10 ⁻⁶ mol/l	Diminution de la viabilité cellulaire Perforation de la membrane plasmique Diminution de la synthèse d'ADN Diminution de la synthèse protéique Réduction de la croissance cellulaire Détachement des cellules et diminution générale de l'activité de transport	

Ainsi, différentes informations épidémiologiques indiquent que la NEB est associée à la consommation d'aliments contaminés par de l'OTA.

Cependant on ne peut pas encore établir avec certitude une relation de causalité.

Tableau 20 Récapitulatif des signes de NEB chez l'homme : [Creppy *et al.*, 1995]

Signes cliniques	Anémie, asthénie, céphalée, polyurie, lumbago Insuffisance rénale, amaigrissement, sensation de goût amer, taux élevé d'avortements spontanés Absence d'œdème
Signes biochimiques	Urémie â-2 microglobulinurie Protéinurie inférieure ou égale à 700 mg/24 heures Amino-acidurie
Signes hématologiques	Anémie normochrome
Signes radiologiques	Contours lisses du rein, réduction du volume rénal (hypotrophie rénale asymétrique ou bilatérale)
Signes anatomo-pathologiques	Fibrose interstitielle, hyalinisation glomérulaire Dégénérescence de l'épithélium tubulaire avec desquamation Perte de la bordure en brosse
Signes histologiques	Amincissement de la membrane basale
Signes immunologiques	Augmentation des Immunoglobulines G et M Dépôt d'immunoglobulines G dans la membrane basale

CONCLUSION

Parmi toutes les espèces étudiées, les porcs semblent les plus sensibles. Cependant on remarque que les tableaux symptomatiques et lésionnels des différentes espèces se ressemblent, on peut donc penser que le mécanisme de toxicité de l'OTA est le même chez tous les animaux et chez l'homme.

La troisième partie s'attachera à détailler le métabolisme de l'ochratoxine dans l'organisme, les bases moléculaires et biochimiques de ses effets biologiques, et la toxicité expérimentale chez des animaux de laboratoire.

PARTIE 3 : CINETIQUE ET ETUDE EXPERIMENTALE

Nous envisagerons successivement le devenir de l'OTA dans l'organisme et les mécanismes délétères.

1-TOXICOCINETIQUE :

La toxicocinétique de l'OTA sera présentée selon un plan classique : absorption, distribution, métabolisme et élimination.

1-1-Absorption :

Dans la plupart des espèces, l'OTA, administrée par voie orale, est absorbée par diffusion passive de la forme non ionisée, liposoluble [Galtier, 1974a, 1974b, Lillehoj *et al.*, 1979, Galtier *et al.* , 1981]. En raison du caractère acide de la mycotoxine ($pK_a=7,1$) cette absorption a lieu dès l'estomac [Galtier, 1978, Roth *et al.* , 1988].

Cependant, comme la vidange gastrique est rapide, l'absorption s'effectue principalement au niveau de la partie proximale du jéjunum [Kanisawa *et al.* , 1990]. L'absorption dans le jéjunum se fait contre un gradient de concentration et est dépendante du pH [Kumagai & Aibara, 1982].

Récemment, il a été montré sur un modèle cellulaire que le passage s'effectuait également par un cotransporteur sodium/glucose [Maresca *et al.* , 2000].

Effet de premier passage et cycle entéro-hépatique :

L'évolution des concentrations plasmatiques étudiées à l'aide d'OTA marquée montre un modèle oscillant après absorption avec une diminution rapide suivie d'une augmentation suggérant un cycle entérohépatique [Roth *et al.*, 1988, Kerkadi *et al.* , 1999].

Le pourcentage d'absorption de l'OTA dans l'intestin est respectivement de 66, 56, 56 et 40% chez le porc, le rat, le lapin et le poulet [Galtier *et al.* , 1981, Suzuki *et al.* , 1977].

Après une exposition orale à dose unique, les concentrations sériques maximales en OTA ont été mises en évidence entre 10 et 48 heures chez le porc et le rat [Mortensen *et al.*, 1983b, Suzuki *et al.*, 1977, Galtier, 1978, Galtier *et al.*, 1981], entre 2 et 4h chez les ruminants [Sreemannarayana *et al.*, 1988], et plus rapidement chez les lapins et les poulets : 1 et 0,33 h respectivement [Galtier *et al.*, 1981].

1-2-Distribution plasmatique et tissulaire :

1.2.1.Fixation aux protéines plasmatiques et fraction libre:

L'OTA dans le plasma est fixée à 90% sur certaines protéines plasmatiques [Hagelberg *et al.*, 1989].

Elle se fixe à l'albumine sérique [Galtier *et al.*, 1980], des différences d'affinité entre espèces ont été constatées. On remarque que l'albumine de porc a la plus grande affinité pour l'OTA (Tableau 21).

Tableau 21 : Constantes d'association entre l'OTA et les albumines sériques : [Galtier *et al.*, 1980].

espèce	Ka (1/M)
porc	$7,1 * 10^4$
poulet	$5,1 * 10^4$
rat	$4,0 * 10^4$
homme	$5,8 * 10^4$

Des études *in vivo* ont montré une toxicité plus importante de l'OTA chez des porcs en présence de phénylbutazone. La D.L.50 passe ainsi de 33,4 mg/kg de PV à 21,1 mg/kg de PV [Galtier *et al.*, 1980]. Cet effet s'explique par une compétition de fixation sur les sites acides de l'albumine ce qui conduit à une augmentation de la fraction libre d'OTA. Par le même procédé, certains acides faibles augmentent la fraction libre de l'OTA et donc ses effets toxiques [Galtier *et al.*, 1993]. Des études avec des rats déficients en albumine ont montré que le premier effet de la fixation de l'OTA aux protéines plasmatiques est de retarder son élimination en limitant son transfert du compartiment sanguin aux cellules rénales et hépatiques, ce qui augmente sa demi-vie [Kumagai, 1985].

En outre, la fraction d'OTA liée à l'albumine sérique et aux autres macromolécules sériques constitue une réserve mobile de mycotoxine qui peut être capable de gagner les tissus pendant longtemps [Galtier, 1978].

La fraction de toxine libre dans le sérum de diverses espèces a été déterminée. Elle est de 0,02% chez l'homme et le rat, 0,08% chez le singe, 0,1% chez la souris et le porc, et 22% chez le poisson [Hagelberg *et al.*, 1989].

Le mécanisme par lequel l'OTA se lie aux protéines n'est pas connu mais il semble que les parties lipophiles des protéines favorisent la liaison. La liaison très spécifique de l'OTA à ces protéines montre qu'elles sont ses cibles préférentielles [Schewrdt *et al.*, 1999].

L'OTA a également une grande affinité pour une macromolécule sérique, non identifiée d'un poids moléculaire de 20000 g/mol. La fixation sur cette macromolécule est un phénomène saturable [Stojkovic *et al.*, 1984].

Les constantes d'association sont de $2,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ et $0,59 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ chez l'homme et chez le porc, respectivement. La saturation de cette macromolécule spécifique intervient à de faibles doses d'OTA, 10 à 20 ng par ml de sérum. Alors que la fixation aux albumines sériques se fait à des concentrations plus importantes d'OTA, la saturation a lieu à des concentrations sériques d'OTA supérieures à plusieurs centaines de $\mu\text{g/ml}$ [Stojkovic *et al.*, 1984].

Enfin, les globules rouges contiennent seulement des traces d'OTA [Galtier, 1978].

1.2.2. Distribution tissulaire :

a- Cas général :

Selon les études, la distribution tissulaire de l'OTA chez le porc, le poulet ou la chèvre suit l'ordre suivant : reins > foie > muscles > graisses [Madsen *et al.*, 1982a, Madsen *et al.*, 1982b, Mortensen *et al.*, 1983a, Harwig *et al.*, 1983] ou : rein > muscle > foie > graisses [Mortensen *et al.*, 1983b, Madsen *et al.*, 1982a et 1982b].

L'OTA est retrouvée aussi dans la bile [Suzuki *et al.*, 1977]. Plus d'une vingtaine de métabolites ont été récemment identifiés chez le rat [Li *et al.*, 2000]. Enfin, l'OTA passe dans le lait et se retrouve en grande quantité dans le sang et le rein des petits [Breitholtz-Emanuelson *et al.*, 1993a].

b- Gestation :

Chez la souris :

L'autoradiographie du corps complet après l'administration intra veineuse de hautes doses d'OTA marquée au carbone 14 (C*), a montré que l'OTA peut franchir le placenta aux 8^{ème} et 9^{ème} jours de gestation, la radioactivité apparaît dans l'utérus, le placenta et les tissus fœtaux 20 minutes après l'injection.

Après une injection intra péritonéale d'OTA aux 11^{ème} et 13^{ème} jours de gestation, les résidus fœtaux apparaissent plus lentement, et atteignent des valeurs maximales 30 à 48 heures après l'injection. Les résidus dans le placenta sont élevés 4 à 6 heures après l'injection, puis les concentrations diminuent plus doucement que dans les autres tissus. Les demi-vies sériques de l'OTA sont de 29 et 24 heures, respectivement, au 11^{ème} et au 13^{ème} jour de gestation [Fukui *et al.*, 1987].

Quand l'administration se fait plus tard pendant la gestation (17^{ème} jour) la radioactivité fœtale est très faible [Appelgren & Arora, 1983a et 1983b].

Les différences de concentrations en OTA retrouvées dans le fœtus aux différents stades de la gestation sont dues aux modifications du placenta qui n'est complètement développé qu'au 9^{ème} jour de gestation.

Chez le rat :

L'injection d'OTA triciée en sous cutané à des rattes au 12^{ème} jour de gestation révèle que le maximum de résidus dans les tissus fœtaux est observé 48 à 72 heures après l'administration. Ils représentent environ 0,1% de la dose administrée [Ballinger *et al.*, 1986].

Chez le porc :

Aucun résidu d'OTA n'est détecté dans les fœtus suite à l'administration par voie orale, à la dose de 0,38 mg/kg de poids vif à des truies gestantes, entre le 21^{ème} et le 28^{ème} jour de gestation [Patterson *et al.*, 1976].

De la même façon, aucun résidu d'OTA n'a été retrouvé chez des porcelets dont les mères avaient été nourries, durant toute la période de gestation avec des aliments faiblement contaminés (7 à 16 ppb) [Mortensen *et al.*, 1983a].

Cependant, des études plus récentes ont montré une transmission d'OTA *in utero* chez 6 porcelets dont la mère avait été nourrie avec des aliments naturellement contaminés (0.4-0.5

ppm). Les concentrations sanguines d'OTA des porcelets nouveau-nés étaient comprises entre 0,075 et 0,12ng/ml, et de 0,20ng/ml pour la truie [Barnikol & Thalmann, 1988].

1.2.3.Demi-vie plasmatique :

La demi-vie plasmatique de l'OTA, après administration orale, varie de 0,68 heure pour le poisson à 510 heures pour le singe, en passant par 24-39 heures pour la souris, 55-120 heures pour le rat et 72-120 heures pour le porc [Stormer, 1992] (Tableau 22). Cette constante pharmacocinétique déterminée chez un humain est de 840 heures [Zingerle *et al.*, 1997].

Tableau 22 : Demi-vie plasmatique de l'OTA après une administration orale :

Animal	Demi-vie sérique (heure)
singes (<i>Macaca mulata</i>)	510
porc	72-120
veau préruminant	77
souris	24-39
rat	55-120
poulet	4,1
caille	6,7

Ces différences entre les espèces sont dues aux différences d'affinité de l'OTA pour l'albumine sérique, ainsi chez les bovins, le porc et les primates, la constante d'association intrinsèque est particulièrement élevée [Galtier, 1979].

1-3-Métabolisme :

Hydrolyse :

Nous envisagerons tout d'abord le métabolisme général commun à toutes les ochratoxines avant de préciser les différences entre OTA et OTB.

In vitro, l'OTA et l'OTB sont hydrolysées en ochratoxine á et en phénylalanine par les enzymes protéolytiques de la digestion : l'á-chymotrypsine et la carboxypeptidase [Pitout, 1969, Pfohl-Leszkowicz, 1999c].

Chez les rongeurs, l'hydrolyse en OTA est liée à la microflore bactérienne du cæcum [Galtier, 1978]. Les enzymes responsables de l'hydrolyse en OTA sont la carboxypeptidase A et la chymotrypsine [Pitout, 1969].

Des études avec des homogénats de tissus ont montré que le duodénum, l'iléum et le pancréas ont une grande capacité à réaliser cette réaction, tandis que l'activité enzymatique dans le foie et dans le rein est faible [Suzuki *et al.*, 1977], voire inexistante dans les hépatocytes de rat [Hansen *et al.*, 1982] et de lapins [Stormer *et al.*, 1983, Kanisawa *et al.*, 1979].

Chez les bovins et les ovins, il y a une hydrolyse effective de l'OTA en OTA par les protozoaires des quatre estomacs. Cette biotransformation explique la relative résistance de ces espèces aux effets de l'OTA [Kiessling *et al.*, 1984].

Dans le foie, la partie phénylalanine de l'OTA peut être hydroxylée par la phénylalanine hydroxylase et convertie en tyrosine-OTA [Creppy *et al.*, 1990].

Péroxydation lipidique :

Dans des microsomes de foie de rat, la peroxydation lipidique participe activement à la conversion de l'OTA en 4(S)-OH-OTA [Omar & Rahimtula, 1993].

Conjugaisons :

In vivo, l'ochratoxine A peut être glucuronosyl-conjuguée ou sulfo-conjuguée dans le foie avant son excrétion urinaire [Galtier *et al.*, 1993, Kane *et al.*, 1986].

En revanche, l'existence de conjugués au glutathion de même que l'existence de dérivés mercapturiques n'a pas été formellement prouvée [Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1994].

Métabolites de l'ochratoxine A :

Deux épimères hydroxylés (la 4(R)-hydroxyochratoxine A et la 4(S)-hydroxyochratoxine A) sont formés lors de l'incubation d'OTA en présence de microsomes hépatiques de rat, de porc ou d'homme [Stormer *et al.*, 1981, Storen *et al.*, 1982] ou après administration par voie intra-péritonéale chez le rat [Hutchinson & Steyn, 1971].

Ces métabolites peuvent aussi être générés par des microsomes de reins [Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993c], des cellules de reins de singe en culture [Grosse *et al.*, 1995a], et des cellules épithéliales bronchiques humaines en culture [Pinelli *et al.*, 1999, El Adlouni *et al.*, 2000].

L'incubation de l'OTA avec des microsomes de foie de lapin conduit aussi à la formation de 10-hydroxyochratoxine A [Stormer *et al.*, 1983].

Ces biotransformations sont dépendantes des monooxygénases à cytochromes P-450 (CYP) [Stormer, 1992, Ueno, 1985, Omar *et al.*, 1990, Grosse *et al.*, 1995b et 1997a], mais aussi des peroxydases [El Adlouni *et al.*, 2000]. Chez le rat, le cytochrome 1A2 joue un rôle majeur dans la formation de l'isomère (R), tandis que l'isomère (S) est essentiellement formé par le cytochrome 2B, bien que d'autres CYP interviennent [Ueno, 1985].

Métabolites de l'ochratoxine B :

L'ochratoxine B, qui correspond à l'OTA déchlorinée, peut être retrouvée associée à l'OTA dans certains produits céréaliers. Chez le rat, elle est moins toxique que l'OTA et est métabolisable en 4-hydroxyochratoxine B et ochratoxine â [Stormer *et al.*, 1985].

1-4-Elimination par excrétion :

Chez le rat (Tableau 23), l'OTA est éliminée par excrétion biliaire et filtration glomérulaire [Li *et al.*, 2000].

Tableau 23 : Clairance corporelle totale via la bile, l'urine et la métabolisation :
[Li *et al.*, 2000]

Métabolite	Clairance(ml/h/kg)
OTA	3,1
OP-OTA	3,6
OTá	40
4-OH-OTA	65
OTB	43

L'OTA, l'OTB et l'OTá sont essentiellement excrétées par les urines (>48%), la 4-OH-OTA dans la bile (41%).

Produits d'excrétion de l'OTA :

Chez le rat, les produits d'excrétion majoritaires sont l'ochratoxine á (à la fois dans l'urine et les fécès), l'OTA, et l'épimère 4R-OH-OTA ; dans l'urine, ils représentent respectivement 25-27%, 6%, et 1-1,5% de la dose administrée [Storen *et al.*, 1982].

Facteurs influençant la voie d'excrétion :

Bien que, chez le rat, les excrétions urinaire et fécale soient d'importance égale, la contribution relative de chaque voie dépend de facteurs tels que le mode et la dose d'administration [Kuiper-Goodman & Scott, 1989].

Dans différentes espèces, la contribution relative de chaque voie d'excrétion est aussi influencée par le degré de fixation aux macromolécules sériques : la liaison de l'OTA aux protéines plasmatiques réduit de façon importante la filtration glomérulaire de cette toxine [Chu, 1971 et 1974]. Elle varie également en fonction de la recirculation entérohépatique de l'OTA [Hagelberg *et al.*, 1989, Fuchs *et al.*, 1988].

Chez des souris, un prétraitement avec du phénobarbital, qui est un inducteur enzymatique, augmente l'excrétion biliaire d'OTA et diminue l'excrétion urinaire d'OTA et d'OTá [Moroi *et al.*, 1985].

Réabsorption de l'OTA au niveau rénal :

L'OTA, excrétée par filtration glomérulaire dans l'urine, est en partie réabsorbée au niveau des tubules rénaux, ce qui conduit à une accumulation dans les cellules rénales [Gekle *et al.*, 1993c] et éventuellement un retour de la mycotoxine dans la circulation sanguine.

La réabsorption de l'OTA peut s'effectuer par un transport passif, actif, ou par compétition avec des anions. Par contre, la réabsorption distale est surtout due à la diffusion de la forme non ionisée de l'OTA [Gekle *et al.*, 1993a].

Dans des cellules tubulaires proximales rénales d'opossum (cellules OK) le transport actif de l'OTA à travers la paroi luminale des cellules tubulaires au niveau de la membrane apicale s'effectue par trois types de transporteurs : les transporteurs de la phénylalanine, les transporteurs H⁺/dipeptides et les transporteurs des anions organiques. Alors qu'au niveau basolatéral, seuls les transporteurs des anions organiques véhiculent l'OTA [Gekle *et al.*, 1993a].

Dans des suspensions de tubules proximaux rénaux de lapins, [Groves *et al.*, 1998] des transporteurs d'acides gras situés sur la membrane péritybulaire semblent aussi jouer un rôle dans l'accumulation de cette mycotoxine : l'acide octanoïque, un acide gras, inhibe par compétition le transport de l'OTA dans ces cellules.

En 1997, un transporteur d'anions organiques a été isolé et cloné à partir de reins de rats. C'est un échangeur anion organique /dicarboxylate de la membrane basolatérale du tubule proximal rénal. Il permet le transport de substrats endogènes comme les nucléotides, prostaglandines, acide urique et des médicaments (antibiotiques, médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens). Le transport de l'OTA dans le rein conduit à la diminution d'ATP dans les cellules du tubule proximal. Cette diminution est contrecarrée par le probénécid, un inhibiteur spécifique du transporteur. Un autre transporteur d'anions organiques véhicule l'OTA au niveau du rein, du foie et du cerveau [Endou, 1998, Bahnemann *et al.*, 1997].

2-TOXICOLOGIE EXPERIMENTALE :

Nous envisagerons dans cette partie les différentes études de toxicité conduites avec l'OTA : toxicité aiguë, toxicité subaiguë et chronique, embryotoxicité, tératogénicité, carcinogénicité...

2-1-Toxicité aiguë :

La comparaison des DL50 dans différentes espèces, en fonction de la voie d'exposition est résumée dans le tableau 24.

Ces résultats indiquent que le chien et le porc sont les espèces les plus sensibles; les souris et les rats sont les moins sensibles. Comme c'est le cas pour beaucoup de xénobiotiques, les rats nouveaux nés sont considérablement plus sensibles que les rats adultes.

De plus, la DL50 est de 30.3 mg/kg chez les rats mâles alors qu'elle est de 21.4 mg/kg pour les rats femelles. Cette différence est suffisamment importante pour qu'on puisse penser à l'influence du sexe dans la toxicité de l'OTA.

On remarque également que la voie d'administration influence la toxicité de l'OTA : chez les rats, la DL50 par voie intraveineuse est de 12.7 mg/kg, elle est de 12.6 mg/kg par voie

intrapéritonéale, ces valeurs sont à comparer à la DL50 par voie orale : 21.4 à 30.3 mg/kg. On peut penser que ces différences sont liées au degré d'absorption de l'OTA (56%).

Enfin, l'administration orale simultanée de phénylalanine (100mg/kg de poids vif) [Moroi *et al.*, 1985] chez la souris, fait passer la DL50 orale de 46 mg/kg à 71 mg/kg, les analogues structuraux de la phénylalanine ont le même effet [Baudrimont *et al.*, 2001].

Tableau 24 : DL50 pour l'ochratoxine A chez différentes espèces animales [Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1993b , Harwig *et al.*, 1983].

Animal	DL50 (mg/kg de poids)	Voie
Rat (mâle)	30,3	orale
Rat (femelle)	21,4	orale
Rat (nouveau-né)	3,9	orale
Rat	12,7	intra-veineuse
Rat	12,6	intra-péritonéale
Souris	46-58,3	orale
Souris	25,7-33,8	intra-veineuse
Souris	22-40,1	intra-péritonéale
Cobaye (mâle)	9,1	orale
Cobaye (femelle)	8,1	orale
Poulet	3,3	orale
Dinde	5,9	orale
Caille japonaise	16,5	orale
Beagle (mâle)	9	orale
Chien (ND)	0,2	orale
Porc (femelle)	1	orale

ND : Non Documenté

Chez le rat, 48h après l'administration orale d'une dose unique d'OTA (0, 17 ou 22 mg/kg PV), des hémorragies multifocales dans de nombreux organes, des thrombi de fibrine dans la rate, dans le plexus choroïde du cerveau [Belmadini *et al.*, 1999], le foie, le rein et le cœur sont constatés. Ces lésions suggèrent une coagulation intra-vasculaire disséminée qui serait due à l'activation des systèmes intrinsèques et extrinsèques de coagulation. Les autres modifications sont une nécrose hépatique et lymphoïde, une entérite avec une atrophie des villosités affectant plus sévèrement le jéjunum et une néphrite. Les lésions myocardiques sont à relier au choc et à l'ischémie [Albassam *et al.*, 1987].

2-2-Toxicité subaiguë et chronique :

La toxicité subaiguë de l'OTA est résumée dans le tableau 25.

Des groupes de 10 rats mâles Wistar sevrés ont été nourris avec des aliments contenant 0 ; 2,4 ; 4,8 ; 9,6 ou 24 ppm d'OTA, partiellement purifiés, ce qui équivaut à 0 ; 0,24 ; 0,48 ; 0,96 et 2,4 mg/kg PV/jour. Aux deux doses les plus élevées, on note des retards de croissance, une diminution de la consommation alimentaire, et une augmentation de l'urécémie . A la dose la plus élevée, le poids relatif des reins est augmenté. Des lésions dégénératives sur l'ensemble du système tubulaire, une diminution du volume d'urine émis est observée pour toutes les doses élevées. Une éosinophilie et une caryomégalie des cellules du tube contourné proximal sont notées à toutes les doses [Munro *et al.*, 1974].

Des résultats similaires sont obtenus après administration intra-péritonéale de 0 ; 0,75 et 2 mg d'OTA par kg de PV par jour pendant 5 à 7 jours. On note une diminution du poids corporel, une augmentation du flux urinaire, une protéinurie, une glucosurie et une altération du transport urinaire des substances organiques (Tableau 25).

L'augmentation de la protéinurie serait due à une interférence avec la réabsorption des protéines par les cellules des tubes contournés [Berndt & Hayes, 1979].

Dans une autre étude, des rats mâles et femelles Fischer ont reçu de l'OTA à des concentrations de 0, 1, 4 ou 16 ppm dans l'aliment, 5 jours par semaine, avec 12 administrations au total réparties sur 16 jours. Tous les rats ayant reçu 16 ppm d'OTA ont eu de la diarrhée et des écoulements nasaux, ils sont morts avant la fin de l'étude. Pour toutes les doses d'OTA supérieures à 1 ppm, il y a eu une augmentation du poids des reins, du cœur et du cerveau, une atrophie du thymus, une nécrose de l'estomac, des surrénales hyperplasiques et hémorragiques [Munro *et al.*, 1974].

Tableau 25 Toxicité subaiguë de l'OTA :

Espèce, sexe, age	N	Voie	mg/kg PV/j [mg/kg dans l'alimentation]	Durée (jours)	Effets	référence
Rat, M En croissance	10	orale	0.24-2.4 [2.4-24]	14	Retards de croissance Augmentation de la concentration sérique en urée Augmentation du poids du rein Diminution du volume d'urée Pathologie rénale	[169]
Rat, M. F. En croissance	15	orale	0.015-0.37 [0.2-5]	90	Diminution du gain de poids Réduction du poids des reins Pas de changement dans la concentration sérique en urine	[169]
Rat, M. adultes	5	gavage	5.15	3	Réduction de la clairance en acide hippurique	[224]
Rat, M. adultes	10	gavage	0.5-2	10	Augmentation de la concentration sérique en urée Augmentation du volume des urines	[92]
Rat M.F. adultes	4-6	IP	0.475-2	5-7	Diminution du poids corporel Augmentation du volume des urines Diminution de l'osmolalité urinaire Augmentation de la protéinurie	[14]
Porc F. 8-12 semaines	3-6	orale	0.008	5-90	Modification des enzymes rénales Atteinte du fonctionnement du rein	[61]

M : mâle, F : femelle, PV : poids vif, j : jour, IP : intrapéritonéale

2-3-Embryotoxicité tératogénicité :

Des groupes de 4 à 26 souris CBA gestantes ont reçu, par gavage, du maïs contaminé par de l'OTA à des concentrations de 0, 1, 2, ou 4 mg/kg PV les 8^{ème} et 9^{ème} jours de gestation ou à 4mg/kg PV aux jours -2 (2 jours avant l'accouplement), 2, 4, 6, 7, 10 et 14 de gestation. A J19, le nombre de fœtus viables et morts et le nombre de sites de résorption ont été déterminés, les fœtus ont été pesés et examinés.

Une mortalité prénatale de l'ordre de 20% est observée pour les groupes ayant reçu 4 mg/kg de PV à J7, J8 et J9. Des anomalies du système nerveux central, des yeux et du squelette axial dépendantes de la dose ont été enregistrées chez les fœtus à J8 et J9.

Les malformations les plus importantes et les plus communes sont celles affectant les structures crâniofaciales. Elles sont liées à une aplasie et une dysplasie des structures supérieures de la face, et se manifestent par des exencéphalies, microcéphalies, anophtalmies, microphthalmies [Arora & Frolen, 1981, Singh & Hood, 1985].

Chez le rat des études visant à évaluer l'embryotoxicité et la tératogénicité de l'OTA ont été conduites par administration de deux fois 2.5 mg/kg d'OTA par voie orale aux 8^{ème} et au 9^{ème} jours de gestation. Il a été noté une augmentation du nombre de résorptions fœtales, une diminution du nombre moyen de fœtus par femelle, une baisse du poids moyen des fœtus et du placenta. Les hémorragies fœtales relevées ont été considérées comme des réponses tératogéniques [Moré & Galtier, 1974].

2-4-Carcinogénicité :

Le pouvoir carcinogène de l'OTA administrée sur de longues périodes a été évalué dans différentes espèces (Tableau 26).

Tableau 26 : Résumé des informations concernant la carcinogénicité de l'OTA chez l'animal [d'après Castegnaro, 1999].

Mode d'administration	Dose (mg/kg PV)	Durée (semaines)	Espèce animale	Evaluation	Référence
Orale	0.7	36	Rats	Tumeur du rein	[198]
Orale	ND	ND	Truies	Hépatomes	[51]
Sous-cutanée	ND	ND	Rats	Fibrosarcomes	[198]
Orale (nourriture)	7	30	Souris mâles	Tumeurs du rein et du foie Adénomes cystiques du rein	[187]
Orale (nourriture)	3.5	70	Souris mâles	Néphropathies Carcinomes Adénomes du rein	[15, 16]
Orale (nourriture)	5.6	44	Souris femelles	Néphropathies Tumeurs du foie	[16]
Orale	2.1	89	Rats mâles	Adénocarcinomes du rein Carcinomes transitionnels de la vessie	[27]

Des souris exposées à 5,6 mg/kg de PV d'OTA pendant 44 semaines ont développé des tumeurs hépatiques et rénales. Les souris témoins n'ont pas développé de tumeurs. Dans une autre étude l'administration de 40 ppm d'OTA pendant plusieurs mois à des souris mâles et

femelles entraîne une augmentation de l'incidence combinée des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires [Castegnaro *et al.*, 1999]. Des études conduites sur des rats mâles et femelles montrent une augmentation dose-dépendante de l'incidence des adénomes et des carcinomes rénaux lors d'exposition prolongée à l'OTA. Aux doses les plus élevées (0,210 mg d'OTA/kg de PV) les adénomes et les carcinomes rénaux sont souvent multiples ou bilatéraux [Castegnaro *et al.*, 1998].

Dans cette même étude, la fréquence de métastases attribuées à des cellules de carcinomes rénaux était élevée : principalement dans les nœuds lymphatiques et les poumons et, chez les femelles, dans les glandes mammaires.

2-5-Toxicité spécifique d'organes :

2.5.1.Néphrotoxicité :

L'OTA a un effet néphrotoxique dans toutes les espèces de mammifères monogastriques chez qui elle a été administrée [Kuiper-Goodman & Scott, 1989, Krogh *et al.*, 1988].

Une exposition à de fortes doses d'OTA affecte gravement le fonctionnement du rein et sa morphologie : ceci est révélé par une augmentation du poids des reins, du volume d'urines émises et de la concentration plasmatique en urée [Hatey & Galtier, 1977], mais aussi par une glucosurie et une protéinurie [Berndt & Hayes, 1979]. Ces résultats indiquent que le site de réabsorption c'est à dire les tubules contournés proximaux est endommagé.

La diminution de la capacité de concentration des urines est due à une altération des transporteurs d'anions organiques localisés sur la bordure en brosse et sur les membranes basolatérales des cellules du TCP [Endou *et al.*, 1986, Sokol *et al.*, 1988].

Une étude conduite sur des segments de néphrons isolés révèle que le segment médial et terminal du tubule proximal sont les plus sensibles aux effets toxiques de l'OTA. On constate une diminution significative des teneurs en ATP dans le cytoplasme et dans les mitochondries [Jung & Endou, 1989].

Des injections sous cutanées d'OTA, à des doses de 10 mg/kg PV pendant 5 jours diminuent les niveaux en muramidase, en lactate déshydrogénase, en phosphatase alcaline, en glutamate déshydrogénase et en phosphatase acide dans les reins [Ngaha, 1985]. L'atteinte de la muramidase serait la plus précoce. De même, de l'OTA administrée par gavage à des doses de 0,145 mg/kg de PV un jour sur deux pendant 8 à 12 semaines, diminue le niveau de lactate déshydrogénase, de phosphatase alcaline, de leucine aminopeptidase et de gamma glutamyl

transférase. Parallèlement à la diminution des activités enzymatiques, la concentration en enzymes dans les urines augmente. Les trois dernières enzymes sont localisées dans la bordure en brosse du tube contourné proximal, on a donc une atteinte de ce site. Enfin l'augmentation tardive de la concentration urinaire en N-acétyl β -glucosidase, une enzyme lysosomale, pourrait indiquer une régénération active avec exfoliation des cellules nécrotiques du tube contourné proximal [Stonard *et al.*, 1987]. Dans la même étude, la mesure de la clairance de l'acide para-aminohippurique a montré une réduction de 56% à deux semaines à 8% à 12 semaines : les dommages rénaux sont donc réversibles.

2.5.2.Hépatotoxicité :

L'administration de 1.25 mg/kg d'OTA par voie orale pendant 8 semaines à des rats sevrés entraîne une augmentation de la quantité de glucose hépatique et une diminution des carbohydrates et du glycogène total [Suzuki *et al.*, 1975]. L'activité des enzymes glycolytiques a été réduite, alors que les enzymes de la néoglucogénèse ont augmenté.

L'effet diabétogène de l'OTA serait dû à une inhibition de la synthèse de l'insuline ou une inhibition de son relargage par les cellules pancréatiques, une diminution de la glycolyse et de la glycogénèse et une augmentation de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse [Subramanian *et al.*, 1989].

2.5.3.Atteinte du système immunitaire :

Plusieurs études se sont attachées à démontrer que l'OTA affecte le système immunitaire, nous avons évoqué un certain nombre d'entre elles dans la partie 2. Voyons les résultats complémentaires qui peuvent être obtenus *in vivo* ou *in vitro*. Chez des poulets nourris avec 2 à 4 mg d'OTA/kg d'aliment pendant 20 jours, la population de cellules lymphoïdes est diminuée dans les organes de l'immunité [Dwivedi & Burns, 1984b].

La taille de thymus de souris a été réduite de 33% par rapport aux témoins après des injections intra-péritonéales de 20 mg d'OTA/kg de PV à jours alternés. L'atteinte du système immunitaire a également été mise en évidence par une diminution de la cellularité de la moelle osseuse [Boorman *et al.*, 1984]. Des résultats similaires ont été obtenus sur des rats [Kanisawa *et al.*, 1977].

L'exposition de rats et de chiens à de fortes doses d'OTA a entraîné l'apparition de foyers de nécrose dans la rate et les nœuds lymphatiques [Kanisawa *et al.*, 1977].

En outre, l'exposition à l'OTA augmente la sensibilité aux irradiations même trois semaines après l'arrêt de l'administration [Hong *et al.*, 1988].

L'OTA et la 4R OH-OTA sont de puissants immunosuppresseurs contrairement à l'OTÁ [Roschenthaler, 1984]. Ces effets pourraient être liés à une inhibition de la synthèse des protéines. En effet l'OTA est un inhibiteur compétitif de la synthèse protéique par action sur la phénylalaninyl-tARN-synthétase. De tous les organes hématopoïétiques étudiés la synthèse protéique est surtout inhibée dans la rate [Creppy *et al.*, 1984].

Les cellules immunocompétentes requerrant une activation, une différenciation et une prolifération, toutes ces étapes sont affectées si la synthèse protéique est inhibée [Creppy *et al.*, 1982]. Ces effets sont transitoires et rétrocedent à l'arrêt du traitement [Harvey *et al.*, 1987].

Ainsi, l'OTA entraîne une réduction du nombre de cellules produisant des immunoglobulines M de 90%, et de 93% des cellules synthétisant des immunoglobulines G. La (4R)-4-hydroxyOTA, elle entraîne une diminution de 80% des cellules produisant des IgM et de 93% de celles produisant des IgG [Creppy *et al.*, 1983a]. L'OTA affecte à la fois l'immunité humorale et l'immunité cellulaire.

De même, la suppression de l'activité des cellules NK constatée serait due à une diminution de la production des interférons basaux [Luster *et al.*, 1987].

3-BASES MOLECULAIRES DE LA TOXICITE :

L'OTA a des effets biologiques et biochimiques variés, ses actions sur l'ADN et la synthèse des protéines expliquant toutefois l'essentiel de ses effets toxicologiques.

3-1-Effets sur l'ADN : génotoxicité et mutagénicité :

3.1.1.Mutagénicité et adduit :

L'OTA a longtemps été considérée comme non génotoxique, les résultats étant plutôt contradictoires (Tableau 27). Ainsi on peut trouver des expérimentations en défaveur de la

génotoxicité : les tests d'Ames effectués sur différentes souches de *Salmonella typhimurium* sont négatifs [Würgler *et al.*, 1991]. L'OTA n'induit pas d'inhibition de la croissance chez les différentes souches de *Bacillus subtilis* testées [Ueno & Kubota, 1976]. De même, aucune recombinaison mitotique n'est observée chez *Saccharomyces cerevisiae* D3 après traitement des cultures par l'OTA [Kuczuk *et al.*, 1978, Krogh, 1987].

Sur les cellules de carcinomes mammaires de souris C3H, l'OTA (5 à 10 µg/ml) ne provoque pas de mutation. De même, aucune mutation n'a été détectée dans les cellules de souris FM3A exposées à l'OTA (5 à 10 µg/ml) en absence d'activation métabolique [Umeda *et al.*, 1977].

Certaines études tendent, en revanche, à démontrer la génotoxicité de l'OTA : une activité mutagène importante a été mise en évidence sur des souches de *Salmonella typhimurium* TA 1535, 1538 et 100 exposées à de l'OTA préalablement métabolisée par des hépatocytes de rats. Une activité mutagène a aussi été observée chez les souches TA 1535, 1538 et 98 exposées à de l'OTA métabolisée par des fractions microsomales de rein de souris en présence de cofacteurs, NADP ou acide arachidonique. Enfin, la mutagénicité induite par l'OTA est plus élevée en présence d'acide arachidonique chez la souche TA 1535 [Obrecht-Pflumio *et al.*, 2001].

Ces résultats suggèrent que la génotoxicité de l'OTA nécessite une activation métabolique, voyons plus en détails les différentes atteintes du patrimoine génétique attribuables à l'OTA.

Chez la souris, l'OTA provoque la formation d'adduits à l'ADN dans différents organes [Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991, Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993a, Obrecht-Pflumio & Dirheimer, 2001]. Cette formation est dépendante de la dose. Après administration *per os* d'une dose unique d'OTA, des adduits apparaissent dans le rein dès 8h, alors qu'ils n'apparaissent qu'au bout de 24h dans le foie et la rate. Au bout de 16 jours, un nombre important d'adduits persiste encore dans le rein, alors que dans le foie et la rate, l'élimination des adduits est complète dès 5 jours. Les adduits varient d'un organe à l'autre et d'une espèce à l'autre en fonction des voies de métabolisation [Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993b, Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993a].

L'administration simultanée de superoxyde dismutase et de catalase avant le gavage des souris par l'OTA provoque une diminution des adduits totaux à l'ADN dans les reins et les testicules (diminution respective de 90% et 30%) [Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993b, Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1994].

Des cellules de rein de singes (cellules Vero) ont été incubées avec des doses croissantes d'OTA (10-100µM). Plusieurs adduits à l'ADN ont été détectés, de façon similaire à ceux formés dans le rein des souris [Grosse, 1995a].

Signalons également que l'OTA entraîne des signes précoces d'atteinte génétique incluant la présence d'adduits à l'ADN dans les organes cibles de souriceaux dont les mères ont reçu une dose unique d'OTA en fin de gestation. Ces résultats suggèrent que l'OTA serait génotoxique à travers la barrière placentaire [Petkova-Bocharova *et al.*, 1998].

Chez l'homme, des adduits similaires à ceux obtenus dans le rein de souris ont été observés dans des échantillons de reins et de vessies d'individus souffrant de NEB et de cancers de voies urinaires [Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993c]. Il y aurait une corrélation positive entre la présence des adduits au niveau du rein et la présence de tumeurs [Castegnaro *et al.*, 1998].

Les cytochromes P450 éventuellement impliqués dans la bioactivation de l'OTA en métabolites génotoxiques ont été recherchés par l'utilisation de cellules humaines dans lesquelles ont été clonés différents CYP. Les CYP utilisés sont les 1A2, 2A6, 2D6, 2E1 et 3A4 [Groene *et al.*, 1996]. Dans tous les cas des adduits ont été observés, mais la quantité varie de 4 à 85 adduits par 109 nucléotides. Certains adduits sont communs à tous les types de cellules y compris celles n'exprimant que des enzymes de conjugaison et pas de CYP, d'autres sont spécifiques du CYP cloné. Le taux le plus élevé d'adduits est observé avec le CYP 1A2 [Grosse *et al.*, 1995b et 1997a].

3.1.2.Synthèses d'ADN non programmées :

Une augmentation concentration dépendante des synthèses non programmées d'ADN a été observée en présence d'OTA dans les cellules épithéliales du tractus urinaire de porc en culture. Le nombre de grains nucléaires nets a augmenté et atteint un maximum à une concentration d'1 µmol d'OTA. Au delà de cette concentration l'OTA s'est avérée cytotoxique.

De même, une désorganisation de la synthèse d'ADN par modification de la réparation a été observée dans des hépatocytes en culture de rats ACI et de souris [Mori *et al.*, 1984].

D'autre part, l'OTA provoque une légère augmentation de la réponse SOS chromotest sans relation dose-effet ainsi qu'une augmentation du SOS spot test [Auffray & Boutibonnes,

1986]. L'étude de l'induction de l'activité de réparation SOS chez *Escherichia coli* PQ37 a montré que 4mM d'OTA induisent une réponse SOS en l'absence d'activateur exogène [Malaveille *et al.*, 1991 et 1994].

3.1.3.Cassures des ADN simple brin :

Des cassures simples-brins ont été observées au niveau de l'ADN de rein, de foie et de rate de souris Balb/c ainsi qu'au niveau de l'ADN de rein et de foie de rats [Kane *et al.*, 1986, Creppy *et al.*, 1985].

3.1.4.Aberrations chromosomiques :

La présence d'aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence de 15nM d'OTA a été démontrée [Manolova *et al.*, 1990]. Ce type d'aberration se retrouve chez les patients souffrant de NEB [Manolov *et al.*, 1991].

3.1.5.Echanges de chromatides sœurs :

Une augmentation des échanges de chromatides sœurs dans des lymphocytes humains cultivés dans un milieu contenant des hépatocytes de rats et de l'OTA a été observée [Henning *et al.*, 1991]. Cet effet a aussi été démontré sur cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) [Kuiper-Goodman & Scott, 1989].

3.1.6.Formation de micronoyaux :

L'utilisation de cellules de vésicules séminales de bélier particulièrement riches en prostaglandine synthétase (PGHS) a permis de montrer que l'OTA provoque la formation de micronoyaux de manière dose dépendante : la fréquence de micronucléi a été doublée à des concentrations de 12 à moles d'OTA et presque triplée à 24 à moles. Les concentrations les plus élevées entraînent toutefois une nette diminution du pourcentage de cellules binucléées, probablement en raison de la cytotoxicité de l'OTA [Degen *et al.*, 1994 et 1997].

3.1.7.Caryomégalies

Chez le rat l'administration d'OTA (0,4 ou 0,8 mg par kg de poids vif chaque 72H) entraîne des caryomégalies avec altération du tissu tubulaire, des mégacytoses, des mitoses anormales et des cellules apoptotiques, ces effets, de même que d'autres signes d'altération de la fonction rénale seraient diminués par l'aspartame [Baudrimont *et al.*, 1997].

Tableau 27 Récapitulatif des éléments en faveur ou en défaveur des effets génotoxiques et mutagènes de l'OTA :

Organe/organisme/type cellulaire	Génotoxicité/Mutagenicité (Effets de l'OTA)	Référence
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Tests d'Ames négatifs	[240]
<i>Bacillus subtilis</i>	Pas d'inhibition de la croissance	[229]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3	Aucune recombinaison mitotique	[131]
Cellules de carcinomes mammaires de souris C3H	Pas de mutation de la résistance	[126]
Cellules de souris FM3A	Pas de mutation génétique	[231]
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535, 1538, 100	Activité mutagène importante	[257]
Rein, foie, rate de souris	Adduits à l'ADN	[182, 183, 74, 83]
Cellules épithéliales du tractus urinaire de porc	Augmentation des synthèses non programmées d'ADN	[50]
Rein, foie, rate de souris et de rats	Cassures simple brin de l'ADN	[40, 116]
Chromosome X de lymphocytes humains	Aberrations chromosomiques	[152]
Lymphocytes humains	Augmentation des échanges de chromatides sœurs	[97]
Cellules de vésicule séminales de bélier	Augmentation du nombre de micronuclei	[45, 46]
Rein de rats	Caryomégalies	[10]

Effets des facteurs alimentaires et environnementaux

L'effet protecteur de l'aspartame serait basé au moins sur deux mécanismes : une modification de la distribution tissulaire et une meilleure élimination urinaire de l'OTA. Ces effets pourraient résulter d'une compétition avec l'OTA pour le transport par les protéines plasmatiques et d'une compétition avec l'OTA pour les transports intrarénaux (à cause de l'analogie structurale entre les deux substances) [Creppy, 1980b].

L'aspartame permet ainsi d'activer l'élimination urinaire des formes libres d'OTA et de diminuer son accumulation dans le rein. Il prévient également sa néphrotoxicité et les changements morphologiques et histologiques, ainsi que la caryomégalie induite par l'OTA dans les tissus rénaux (cellules épithéliales tubulaires).

3-2-Effets au niveau de la transcription et de la traduction :

3.2.1.description :

Un des premiers effets [Creppy *et al.*, 1980a, Creppy *et al.*, 1980b] de l'OTA est une inhibition de la synthèse protéique aussi bien chez les procaryotes [Konrad & Roschenthaler, 1977] que les eucaryotes [Creppy *et al.*, 1979], *in vitro* et *in vivo*. Dans un deuxième temps, les synthèses d'ADN et d'ARN peuvent être inhibées [Creppy *et al.*, 1983b].

Le degré d'inhibition de la synthèse protéique, 5 heures après l'administration d'1mg/kg de poids vif, varie en fonction des organes de 26% dans le foie à 68% dans le rein et 75% dans la rate.

L'inhibition de la synthèse protéique est spécifique et a lieu au niveau posttranscriptionnel. L'OTA a un effet direct sur le transfert des acides aminés : elle inhibe spécifiquement la synthèse des protéines en entrant en compétition avec la phénylalanine (Phe), lors de la réaction d'amino-acylation de l'ARN de transfert phénylalanine-tARN par la phénylalanyl-t-ARN^{Phe} synthétase [Heller & Rösenthaler, 1977, Konrad & Roschenthaler, 1977, Creppy *et al.*, 1979]. Il en résulte un arrêt de la réaction d'aminoacylation et de l'élongation peptidique.

Dans cette réaction, l'OTA est un « analogue » de la phénylalanine, dans des cultures cellulaires, l'inhibition compétitive peut être abolie par une augmentation de la concentration en phénylalanine [Creppy *et al.*, 1979]. Ces effets biochimiques ont des conséquences *in vivo*, ainsi, chez la souris, la létalité d'une dose aiguë d'OTA (0,8 mg) injectée par voie intra péritonéale a été complètement prévenue grâce à l'injection simultanée d'1 mg de phénylalanine [Creppy *et al.*, 1980b].

L'affinité de la phénylalanyl-t-ARN^{Phe} synthétase pour l'OTA est plus faible que pour la phénylalanine avec un rapport qui varie de 1/300 ($K_m=1,3$ mM pour l'OTA et $3,3$ μ M pour la phénylalanine) à 1/20 dans le foie de rat ($K_m=0,28$ mM pour l'OTA et 6 μ M pour la phénylalanine) [Rösenthaler *et al.*, 1984]. Malgré ces différences d'affinité, l'inhibition de la phénylalanyl-t-ARN^{Phe} synthétase par l'OTA est très efficace car l'OTA est beaucoup plus concentrée dans les cellules que la phénylalanine.

Des analogues de l'OTA chez qui la phénylalanine a été remplacée par d'autres acides aminés, comme la tyrosine, ont le même effet inhibiteur sur les ARNt synthétases spécifiques des acides aminés de remplacement [Creppy *et al.*, 1983a].

On peut noter que la (R) OH-OTA a le même effet que l'OTA sur la synthèse protéique, alors que l'OTá n'en a pas [Creppy *et al.*, 1983b].

3.2.2.conséquences sur le métabolisme des glucides :

Une des voies majeures du métabolisme des glucides au niveau du cortex rénal est la néoglucogénèse. Une baisse de 25% de la néoglucogénèse rénale est observée chez le rat ayant reçu 2 mg d'OTA par kg de poids vif pendant 2 jours [Meissner & Cimbala, 1986a]. Ceci provient du fait que l'OTA inhibe la synthèse de l'ARN messenger codant la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK). Cet effet s'accompagne d'une baisse de l'activité PEPCK [Meissner & Selenik, 1979, Meissner & Krogh, 1986b, Meissner *et al.*, 1983].

Il a été montré chez le lapin que l'OTA a un effet hyperglycémiant [Verma & Shalini, 1998]. Cette hyperglycémie résulte d'une stimulation de la glycogénolyse [Shalini, 1996] et d'une augmentation de la néoglucogénèse à partir des acides aminés glucoformateurs.

3-3-.Effets sur le métabolisme des lipides :

In vitro comme *in vivo*, l'OTA augmente la peroxydation lipidique : l'addition d'OTA à des microsomes de foie stimule à la fois la peroxydation lipidique enzymatique (NADPH dépendante) et chimique (ascorbate/FeSO₄ dépendante). Il a été postulé que l'OTA entraîne la peroxydation en facilitant la réduction NADPH (ou ascorbate) dépendante de Fe³⁺ en Fe²⁺ et/ou en facilitant l'étape d'initiation de la peroxydation lipidique. La peroxydation des membranes du réticulum endoplasmique modifie l'homéostasie calcique au niveau des microsomes hépatiques et du cortex rénal, ce qui conduit à une augmentation du taux de calcium cytosolique et une modification de la calcémie [Khan *et al.*, 1989].

La prévention de la peroxydation lipidique induite par l'OTA sur des cellules de singe « Vero » est possible en utilisant de l'aspartame, du piroxicam (un anti-inflammatoire non stéroïdien) et de la superoxyde dismutase associée à la catalase [Baudrimont *et al.*,1997].

3-4-Effets sur la respiration mitochondriale :

L'OTA réduit la respiration mitochondriale *in vitro* par altération des transporteurs de phosphate de la membrane mitochondriale et par inhibition compétitive de l'activité ATPasique de la membrane interne [Meissner & Chan, 1974]. Elle inhibe par compétition l'activité de la succinate déshydrogénase et celle de la cytochrome C oxydase dans la mitochondrie de rat [Wei *et al.*, 1985]. Elle inhibe la phosphorylation oxydative, sans être un agent découplant de cette dernière et l'activité de certaines enzymes indispensables au cycle de Krebs [Moore & Truelove, 1970]. Il en résulte une diminution de la production d'ATP.

CONCLUSION :

L'OTA est facilement absorbée et toxique dès l'administration de faibles doses.

Les études de toxicité montrent que l'organe cible est le rein : dans chaque espèce, l'exposition à l'OTA s'est traduite par une néphropathie progressive caractérisée par une atteinte de la fonction rénale.

Au long terme, l'OTA se révèle avoir une action carcinogène.

Face à la sévérité des intoxications dans les espèces animales et aux problèmes de la contamination de l'alimentation, une évaluation récapitulative des risques et des dangers est nécessaire.

PARTIE 4 : EVALUATION DU RISQUE :

1-RISQUES POUR LES ANIMAUX :

La France est le pays le moins touché de tous les pays d'Europe ayant évalué l'importance de l'ochratoxicose animale clinique sur leur territoire [Creppy, 2002].

L'évaluation du risque pour l'animal s'articule autour de trois points : tout d'abord les risques d'intoxication aiguë ou chronique au niveau individuel, ensuite les pertes zootechniques liées à la baisse de la productivité causée par les ochratoxines, enfin la possibilité de retrouver des résidus d'OTA dans le lait, les œufs, la viande destinés à la consommation humaine (Tableaux 29 et 30).

1-1-Exposition :

En France, l'analyse de 117 échantillons d'orge, de blé, de maïs, d'avoine, de seigle, de son et de divers autres produits végétaux destinés à l'alimentation des animaux a révélé des teneurs en OTA en général inférieures à 5 µg/kg, sauf dans 6 d'entre eux.

L'avoine et l'orge sont les céréales les plus fréquemment contaminées, avec un maximum de 28 µg/kg dans un échantillon d'avoine [DGCCRF, 1999 et 2000].

Tableau 28 Teneur en OTA (µg/kg) dans des céréales destinées à l'alimentation des animaux en France [DGCCRF, 1999 et 2000].

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Fréquence de contamination		Contamination des échantillons > 0.5
		< 0.5	> 0.5	
orge	28	23	5	4.4-6.4-7.2-9.1-9.5
blé	31	30	1	1.7
maïs	26	23	3	0.7-1.7-1.4
avoine	6	2	4	3.5-4.6-7.1-28
son	13	12	1	0.6
seigle	3	2	1	0.7
Luzerne, gruau, tritical, pois protéagineux, farine pour volailles, mélange de céréales, graines de lin, brisures d'amandes, pailles et poussières	10	9	1	1.1
TOTAL	117	101	16	

1-2- Cas du porc :

Nous avons vu au cours de la deuxième partie que le porc était l'espèce animale la plus sensible dans les conditions naturelles d'exposition à l'OTA. Nous aborderons maintenant, plus précisément, le statut de l'ochratoxicose porcine en France, les données sont résumées Tableau 29.

1.2.1. Manifestations cliniques :

Des teneurs en OTA dans l'aliment des porcs inférieures à 0.2 ppm n'entraînent aucun impact clinique. A partir de 0.2 ppm et jusqu'à 1 ppm, les porcs exposés sur des périodes de 3 mois à deux ans montrent des signes d'intoxication chronique à l'OTA. L'organe le plus atteint demeure le rein et on assiste au développement d'une néphropathie progressive [Krogh *et al.*, 1974].

Si on augmente encore la concentration en OTA des aliments, de 2 à 4 ppm, on assiste toujours à une forme d'ochratoxicose chronique, cependant les signes cliniques sont plus marqués que précédemment : diminution de la consommation alimentaire, retards de croissance... [Cook *et al.*, 1986, Hollinger & Ekperigin, 1999].

Des teneurs en OTA de 5 à 10 ppm entraînent une intoxication aiguë : après des épisodes de dépressions, d'abattement (cf. partie 2) les animaux meurent en 5 jours à 3 semaines [Hollinger & Ekperigin, 1999].

De 20 à 50 ppm, la mort intervient en 1 à 3 jours [Szczzech *et al.*, 1973].

1.2.2. Impact zootechnique :

Des teneurs en OTA dans l'aliment des porcs inférieures à 0.2 ppm n'entraînent aucune retombée sur le fonctionnement de l'exploitation. En revanche lorsque les teneurs en OTA s'échelonnent de 0.2 à 4 ppm, les conséquences économiques sont visibles. Elles résultent de la PUPD [Krogh *et al.*, 1974] qui entraîne un salissement des sols, une augmentation des risques de chutes, des pathologies cutanées, du temps de nettoyage des locaux. Le manque à gagner est surtout lié à une diminution du GMQ et à des retards de croissance.

1.2.3.Persistance de résidus :

Chez le porc, l'administration d'une alimentation contenant 1 ppm d'OTA pendant 3 mois entraîne une concentration résiduelle en OTA dans les reins de 27 ppb [Krogh, 1978]. La prolongation de l'étude jusqu'à 2 ans n'a pas modifié cette teneur [Krogh, 1978].

En cas d'intoxication aiguë les teneurs résiduelles en OTA sont beaucoup plus élevées. Des porcs nourris avec des aliments contaminés à plus de 16 ppm sont morts en 5 jours, leurs reins contenaient 283 ppb d'OTA et leurs foies, 189 ppb [Elling *et al.*, 1985]. Mais on peut penser que les carcasses de ces animaux présentant des lésions macroscopiques auraient été retirées de la consommation humaine.

En résumé on peut estimer que, compte tenu des niveaux de contamination des aliments destinés aux porcs charcutiers (cf. Tableau 28) les risques liés à une ochratoxicose chez le porc en France sont minimales.

Cette hypothèse est confirmée par un plan de surveillance expérimental de la contamination des rognons de porc par l'OTA en France mis en place en 1998 [Guillou, 1998]. 300 rognons de porc apparemment sains ont été prélevés par les Services Vétérinaires des 12 départements ayant les tonnages d'abattage de porcs les plus importants. 100 de plus, porteurs de lésions néphropathiques et déclarés impropres à la consommation humaine ont été prélevés par les Services Vétérinaires de la côte d'Armor. Après analyse, 12.3% des rognons de porc destinés à la consommation humaine révélaient la présence de traces d'OTA, l'échantillon le plus contaminé contenait 1.4 µg/kg d'OTA.

6 des 100 rognons néphropathiques contenaient de l'OTA à des concentrations variant de 0.16 à 0.48 µg/kg.

Par comparaison, une étude germanique conduite en 1991 et portant sur 354 rognons de porcs avait montré que 13.3% d'entre eux présentaient des traces d'OTA à une teneur moyenne d'environ 1 µg/kg. Des études canadiennes de 1984 basées sur l'analyse de la teneur en OTA dans le sang de 429 porcs conduits à l'abattoir ont montré que 65% d'entre eux présentaient une ochratoxinémie de l'ordre de 16 µg/l [Guillou, 1998].

Tableau 29 Nature du risque lié à l'ingestion d'aliment contaminé par de l'OTA chez le porc :

Concentration en OTA dans l'aliment	Durée de l'exposition	Nature du risque			Références
		Intoxication	Zootechnique	Résidus	
<0.2 ppm	chronique	non	non	non	[128]
0.2 – 1 ppm	chronique (3 mois à deux ans)	chronique	oui	oui	[128] [214]
2 – 4 ppm	Plusieurs mois	chronique	oui	oui	[100]
5 – 10 ppm	3-4 semaines	subaiguë	oui	non	[100]
20- 50 ppm	Quelques jours	aiguë	oui	non	[62, 226]

1-3-Volailles :

1.3.1.Manifestations cliniques:

Pour des teneurs en OTA variant de 4 à 8 ppm, avec des expositions de plusieurs semaines, les poulets développent une forme d'ochratoxicose chronique : perte de poids, baisse du GMQ... [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Des teneurs en OTA dans l'aliment de 10 à 20 ppm entraîne une ochratoxicose aiguë avec atteinte de l'état général et possible mortalité [Hollinger & Ekperigin, 1999].

1.3.2.Impact zootechnique :

Pour des teneurs en OTA dans l'aliment comprises entre 0.5 et 2 ppm, lors d'exposition chronique de poulets de chair, les effets délétères sont surtout caractérisés par une anémie et une atteinte des organes lymphoïdes [Ramadevi *et al.*, 1998, Sujani & Sriraman, 2000, Hollinger & Ekperigin, 1999].

A partir de niveaux de contamination supérieurs à 4 ppm, les risques sont importants : les poulets de chair ont un faible gain de poids, ils sont plus sensibles aux infections... [Hollinger & Ekperigin, 1999].

Les élevages de poules pondeuses voient la production d'œuf chuter dès 0.5 ppm d'OTA dans l'alimentation [Hollinger & Ekperigin, 1999].

1.3.3.Persistance de résidus :

Des poussins de 1 jour nourris pendant 341 jours avec des aliments contaminés de 0.3 à 1 ppm par l'OTA avaient des teneurs résiduelles en OTA dans les reins et le foie atteignant 50 ppb, pourtant les lésions n'étaient visibles qu'au microscope [Krogh *et al.*, 1977].

Tableau 30 Nature du risque lié à l'ingestion d'aliment contaminé par de l'OTA chez les volailles :

Concentration en OTA dans l'aliment	Durée de l'exposition	Nature du risque			Références
		Intoxication	Zooteknique	Résidus	
0.5-2 ppm	6 à 50 semaines	chronique	oui	oui	[100, 199]
4-8 ppm	3 semaines	chronique	oui	oui	[107]
10-20 ppm	Quelques jours	aiguë	oui	non	[100]

Rappelons pour finir que les volailles sont plus résistantes à l'OTA que le porc. En France les niveaux de contamination des aliments pour animaux rendent donc peu probable le risque de voir apparaître des ochratoxicooses chez les volailles.

1-4-Ruminants :

L'OTA est retrouvée à la fois dans les fourrages (ensilages de maïs, fourrages secs mal conservés...) et dans les aliments concentrés ou composés (à base de maïs, d'orge, d'avoine, de seigle, de blé, d'oléagineux...) qui composent la ration des ruminants en France. L'OTA est métabolisée dans le rumen en phénylalanine et en OTa non toxique (cf.partie 2, les ruminants.). Elle peut également être estérifiée en OTC de toxicité équivalente à celle de l'OTA. L'action du rumen est fortement sous la dépendance du type d'alimentation qui peut modifier l'écosystème microbien. Ainsi la capacité de dégradation de l'OTA chute dans le cas d'une ration très concentrée par rapport à une ration à base de fourrage [Yiannikouris & Jouany, 2002].

Des vaches exposées à 16,6 mg d'OTA par kg de PV par jour pendant 4 jours n'ont montré aucun signe d'intoxication [Hollinger & Ekperigin, 1999].

On peut donc dire qu'en France, les risques inhérents à une ochratoxicose chez les ruminants sont presque nuls.

2.RISQUES POUR L'HOMME

Nous envisagerons l'estimation du risque chez l'homme associé à la prise d'aliments contaminés par de l'ochratoxine.

2-1-Estimation de la DJA :

Une évaluation toxicologique de l'OTA a été effectuée dans le cadre du comité mixte FAO/OMS [JECFA, Joint Expert Committee on Food Additives] en 1990, 1995 et 1998. En 1990, le JECFA a décidé d'établir une DHFPC (c'est à dire une dose tolérable hebdomadaire) pour l'homme de 112 ng/kg de poids corporel. Ceci correspond à une dose journalière de 16 ng/kg de poids. Cette dose a été établie exclusivement en relation avec l'apparition d'effets néphrotoxiques chez le porc. Ce chiffre a été arrondi à 100 ng/kg de poids corporel à la 44^{ème} réunion (OMS, 1996), à l'occasion de laquelle l'évaluation a été confirmée, pour l'essentiel. Une nouvelle réunion JECFA, en 1998, a confirmé cette valeur. La DHTP a été calculée à partir des données obtenues sur le porc car une concentration sans effet observé de 8 µg/kg de poids corporel/jour pendant deux ans.

Certains auteurs ont prétendu que le JECFA n'avait pas pris en compte la carcinogénicité de l'OTA dans son évaluation [Document Codex CX/FAC99/14] mais cela est inexact.

Le JECFA a examiné la carcinogénicité de l'OTA et conclu que les tumeurs rénales n'étaient observées qu'à un niveau supérieur à la dose maximale tolérable (DMT). Ces données semblaient montrer qu'un mécanisme secondaire entrainé en jeu, à savoir la toxicité chronique pour des cellules du tubule rénal, et pouvait être pris en compte par le seuil de concentration sans effet observé pour la toxicité chronique. Pour d'autres, une évaluation de la DMT doit être basée sur la concentration sans effet observée pour les tumeurs chez le rat [Walker, 1999].

Les différentes autorités appliquent diverses méthodes d'évaluation des risques que présente l'OTA selon qu'elles considèrent ou non que la carcinogénicité de l'OTA est fonction d'un mécanisme de seuil. Ces différences se retrouvent dans les mesures de gestion des risques qui ont été prises ou qui sont proposées [Walker, 1999]. Ainsi, un groupe convoqué sous l'égide des pays du nord de l'Europe a fait reposer son évaluation des risques sur un mécanisme présumé de génotoxicité sans seuil et a proposé une dose journalière tolérable (DJT) de 5ng/kg de poids corporel/jour. Cette hypothèse repose en partie sur une évaluation effectuée par les autorités canadiennes et qui souligne la nature agressive et envahissante des tumeurs rénales chez les rongeurs qui correspondait sans doute, a-t-on considéré à un mode d'action génotoxique. Un facteur de sécurité de 5000 a été utilisé, on a abouti à un calcul estimatif de la DJT de 1.5 à 5.7 ng/kg de poids corporel. On peut constater que l'emploi d'un facteur 5000 n'a pas été justifié selon les principes des critères de santé définis par l'OMS en 1994 mais semble avoir été adopté en fonction de « préoccupations liées aux propriétés toxiques et pharmacocinétiques ».

Enfin, la Commission européenne, en 1998 a revu son avis sur l'OTA, en fonction des évaluations mentionnées ci-dessus. Ce comité a conclu que l'OTA est un agent néphrotoxique puissant et un carcinogène et qu'il a des propriétés génotoxiques, par conséquent il serait prudent de réduire l'exposition autant que possible.

2-2-Exposition alimentaire :

La contamination des aliments peut se produire à deux niveaux : directement sur les céréales ou indirectement par la présence de résidus dans les aliments d'origine animale.

Nous décrivons ces deux sources de contamination avant d'évaluer leur part respective.

2.2.1.Céréales et dérivés :

On retrouve l'ochratoxine A essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine...) ainsi que dans le riz, le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs (figes, pruneaux) [Krogh *et al.*, 1977 et 1987]. On note également sa présence dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes [Majerus *et al.*, 1991]. On la retrouve aussi dans la bière [Scott & Kanhere, 1995] et même dans le vin et les jus de raisin [Mac Donald *et al.*, 1999]. Les concentrations en OTA retrouvées dans les

aliments varient de quelques ng/kg à plusieurs dizaines de mg/kg [Krogh, 1987, Kuiper-Goodman & Scott, 1989].

L'analyse des concentrations en OTA dans des produits céréaliers en France (Tableau 31) a montré que la concentration maximale rencontrée était de 2 µg/kg dans des flocons d'avoine, tous les échantillons analysés avaient une concentration en OTA inférieure à 3 µg/kg [DGCCRF, 1999 et 2000].

Tableau 31 Teneur en OTA en µg/kg dans différents produits céréaliers destinés à l'alimentation humaine en France [DGCCRF, 1999 et 2000].

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons analysés	Fréquence de contamination		Contamination > 0.5
		<0.5	>0.5	
Orge	1	1		
Semoule de blé	7	6	1	0.9
Couscous	5	5		
Boulgour	5	5		
Germe de blé	1	1		
Blé dur	3	3		
Céréales au son de blé	1	1		
Semoule de maïs	9	8	1	1.1
Flocons de maïs	3	3		
Farine de maïs	2	2		
Maïs doux	4	4		
Avoine en flocons	7	6	1	2
Riz (dont 15 Camarguais)	16	15	1	1.4
Muëсли	4	2	2	1-1.8
Céréales gourmandes	2	1	1	0.8
Fruits et flocons	1	1		
Farine de seigle	1	-	1	0.8
Choco pearl	1	1		
Céréales mélangées	2	2		
TOTAL	75	67	8	

2.2.2. Problème des résidus :

L'OTA est fréquemment retrouvée dans le muscle de porc et de volaille ainsi que dans les abats et les viandes d'animaux recevant des aliments contaminés [Jorgensen, 1998] (Tableau 32). On a pu mettre en évidence l'OTA dans le sang et les tissus des animaux d'élevage où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique [Hult *et al.*, 1984] (cf.4.1).

Le temps nécessaire à l'élimination complète de la toxine varie de 24h à plusieurs semaines [Micco *et al.*, 1987 et 1988, Prior *et al.*, 1980].

La présence naturelle d'OTA dans des œufs commercialisés n'a pas été démontrée [Edlefsen & Brewer, 1996].

Tableau 32 Teneur en OTA dans des denrées d'origine animale [Jorgensen, 1998].

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons	<LD	LD-0,99 µg/kg	>1 µg/kg	Valeur maximale (µg/kg)
Porc (conventionnel)	76	12	62	2	1.3
Porc (biologique)	7	3	4	0	0.12
Canard	19	8	11	0	0.09
Foie de canard	7	3	4	0	0.16
Dindon	17	7	10	0	0.11
Foie de dindon	17	14	3	0	0.28
Oie	12	7	5	0	0.10
Foie d'oie	12	8	4	0	0.06
Poulet	65	29	36	0	0.18

Les résidus d'OTA ne sont généralement pas retrouvés chez les ruminants car l'OTA est clivée dans les préestomacs par les enzymes des protozoaires et des bactéries [Hult *et al.*, 1976] (cf partie 3).

Pourtant, en Suède, la présence d'OTA dans du lait de vaches a été démontrée (Tableau 33) dans différentes laiteries [Breitholtz-Emanuelson, 1993b].

Tableau 33 Présence d'OTA dans du lait de vaches [Breitholtz-Emanuelson, 1993b]

Laiterie	Nombre d'échantillons Concentration en OTA (ng/l)	
	<10 ng/l	10-40 ng/l
Lycksele	4	2
Ostersund	5	1
Uppsala	5	1
Visby	6	0
Malmö	5	1

2.3.3. Contribution relative des produits céréaliers et des denrées d'origine animale :

Des estimations de l'ingestion d'OTA basées sur le régime alimentaire et les niveaux de contamination moyens ont été faites dans le cadre de la Commission du Codex Alimentarius en 1998 (Tableau 34). En ce qui concerne la consommation de café, de vin rouge et de bière on a utilisé les chiffres pour les pays à forte consommation.

Cette analyse montre que les principales sources d'OTA dans le régime alimentaire sont les céréales suivies des boissons (jus de raisin, vin, café, bière). Les productions animales n'arrivent que bien après. L'apport d'OTA par les céréales varie par ailleurs fortement selon les pays (Tableau 35).

Tableau 34 : Ingestion d'ochratoxine sur la base de données européennes
(d'après le document de travail du CCFAC CX/FAC99/14)

Produits alimentaires	Concentration moyenne d'OTA en µg/kg	Consommation en g/jour	Apport quotidien d'OTA en ng/kg de poids corporel*	% de l'ingestion totale
Céréales	0,5	226	1,9	54
Vin rouge	0,19	171	0,54	15
Café	0,9	29	0,43	12
Bière	0,07	234	0,27	7,6
Viande de porc	0,1	76	0,13	3,7
Raisins secs	2,8	2,3	0,11	3,1
Epices	11	0,05	0,09	2,6
Volaille	0,03	53	0,03	0,9
Légumes secs	0,1	12	0,02	0,6
**Jus de raisin	1,0	50	0,8	19
TOTAL			3,5	

* : poids corporel de 60 kg

** : Aucune donnée fiable de consommation, non pris en compte dans l'ingestion totale

Tableau 35 Apport en OTA par les céréales dans différentes régions du monde
[codex alimentarius]:

Région	Consommation g/jour	Teneur moyenne en OTA (µg/g)	Prise journalière d'OTA (ng/kg PC)	% de la DJA (pays nordiques)	% de la DJA (JECFA)
Europe	226.3	1.6	6.0	120	43
Moyen-orient	430.8	1.6	11.5	230	82
Extrême-Orient	452.3.	1.6	12.1	242	86
Afrique	318.4	1.6	8.5	170	61
Amérique Latine	253.5	1.6	6.7	134	48

2.3.Vérification de l'exposition :

Chez l'homme, après ingestion d'aliments contaminés, on retrouve l'OTA dans le sang, l'urine et les tissus. On la retrouve aussi dans le lait maternel [Breitholtz-Emanuelson *et al.*, 1993b].

L'exposition humaine peut être appréciée à travers le dosage de l'OTA dans les aliments et dans le sang humain [Creppy, 2002]. Cette exposition a été observée dans plusieurs pays d'Europe, elle demeure fort préoccupante dans la région de l'Europe orientale où son ingestion est associée à des maladies rénales chroniques, telles que la néphropathie endémique des Balkans (cf. partie 2).

En France, une évaluation de l'ochratoxicose humaine a été basée sur la mesure des concentrations sériques en OTA chez des hommes et des femmes résidant en Alsace, en Aquitaine et dans la région Rhône-Alpes [Creppy, 1993].

Dans la région Alsace (Tableau 36), 94% des échantillons positifs ont des concentrations inférieures ou égales à 2 ng/ml. Les sérums des « ruraux » sont environ 2.4 fois plus souvent positifs que ceux des « citadins ». Toutes les valeurs dépassant 2 ng/ml ont été trouvées chez des ruraux avec une valeur maximale de 11.8 ng/ml. En Aquitaine, les maxima observés chez les « ruraux » et les « citadins » sont relativement proches (120 ng/ml et 130 ng/ml). En région Rhône-Alpes, on remarque que les « ruraux » ont des concentrations sériques en OTA plus élevées.

Toutes populations confondues, la fréquence globale de l'ochratoxicose est de 19.6% en Alsace, 18.7% en Aquitaine et 14.6% en région Rhônes-Alpes.

Tableau 36 Fréquence de l'ochratoxicose humaine dans 3 régions de France**[Creppy, 1993]**

Origine des échantillons	Ruraux (% de positifs)	Citadins (% de positifs)	
ALSACE			
Taux de contamination (ng/ml)	230 échantillons	270 échantillons	
0.1-0.2	22.1	8.5	
>0.2-1	7.8	2.22	
>1-2	1.3	3.3	
>2	2.6	0	
Total	33.6%	14.02%	
AQUITAINE (échantillons provenant de la Mutuelle Agricole ou du Centre de Santé)			
Taux de contamination (ng/ml)	212 échantillons	853 échantillons	
0.1-0.2	3.8	3.2	
>0.2-1	2.8	5.7	
>1-2	5.2	4.2	
>2	10	4.7	
Total	22.2%	17.8%	
AQUITAINE (échantillons provenant du Centre de Transfusion Sanguine)			
Taux de contamination (ng/ml)	201 échantillons	789 échantillons	
0.1-0.2	1.9	3	
>0.2-1	11.4	8.5	
>1-2	2.9	2.7	
>2	1.9	4.4	
Total	18.4%	18.9%	
RHONE-ALPES			
	Ruraux	Citadins	Citadins en milieu rural
Taux de contamination (ng/ml)	309 échantillons	176 échantillons	30 échantillons
0.1-0.2	7.8	3.4	3.3
>0.2-1	9.4	2.9	0
>1-2	1.9	0	10
>2	0.3	0	0
Total	19.4%	6.3%	13.3%

2-4-Règlementation :

En fonction des pays et de leur législation spécifique les teneurs maximales autorisées en OTA dans les céréales varient de 5 à 50 µg/kg (Tableau 37) [Höhler, 1998].

La 32^{ème} session de la CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants) a décidé de revenir sur le niveau de contamination maximal en OTA toléré dans les céréales et les produits céréaliers. La délégation des Etats Unis a soutenu qu'un niveau de 20 µg/kg pourrait être acceptable en termes de sécurité sanitaire des aliments. Cette délégation a également souligné que le blé et l'orge sont les contributeurs majoritaires dans la prise d'OTA, alors que la contribution des autres céréales est moins significative et ne justifie pas l'établissement d'un niveau maximum commun applicable à l'ensemble des céréales.

La délégation de Suède a par contre souligné que beaucoup d'aliments contribuent à l'ingestion totale d'OTA et que les niveaux doivent être maintenus les plus bas possibles. Cette délégation a aussi indiqué que le riz contribue significativement à l'apport d'OTA en Europe. D'autres délégations ont indiqué que les niveaux trouvés dans les céréales en Europe justifieraient un niveau encore inférieur de l'ordre de 3 µg/kg.

Après une longue discussion, le comité a décidé qu'il serait généralement acceptable et pratiquement réalisable d'établir un niveau maximum de 5 µg/kg d'OTA dans les céréales, blé, orge et produits dérivés du riz [ALINORM, 2001].

Tableau 37 : Réglementations pour l'OTA par pays et par produits
(textes officiels et propositions) [Canet, 1999].

OTA (µg/kg)	Pays	Produit
5	Autriche	Blé, seigle
50	Brésil	Riz, orge, haricots, maïs
25	Danemark	Rognons de porc
5	Danemark	Céréales (produits)
5	France	Céréales
20	Grèce	Café (grains)
50	Israël	Céréales (produits) Légumineuses (produits)
20	Rép. Tchèque	Tous les aliments
5	Rép. Tchèque	Aliments pour enfants
1	Rép. Tchèque	Aliments pour nourrissons
5	Roumanie	Tous les aliments
2	Suisse	Céréales (produits)
50	Uruguay	Riz, orge, haricots, café, maïs
5	CEE	Céréales
3	CEE	Céréales (produits)
10	CEE	Raisins secs

CONCLUSION :

En France, compte tenu du niveau de contamination moyen en OTA des aliments du bétail, les risques d'intoxication ou de perte économique sont faibles. Pour ce qui est de l'exposition humaine, on peut penser qu'une meilleure prise en compte des facteurs influençant le développement des *Aspergillus* et *Penicillium* responsables de la présence d'OTA dans les aliments pourraient assurer un niveau de contamination quasi nul. Seul demeurera alors le problème des denrées importées de pays où la réglementation concernant l'OTA est peut être trop souple.

CONCLUSION GENERALE :

Au terme de cette étude, nous pouvons relever un certain nombre de points clefs dans la toxicité de l'OTA.

Sa production s'effectue principalement par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Ces deux moisissures n'ayant pas les mêmes conditions de toxino-génèse, on retrouve de l'OTA à travers le monde entier. L'étude de ses propriétés a révélé qu'il s'agissait d'une toxine particulièrement stable, notamment à la température, ce qui explique qu'on la retrouve dans nombre de denrées destinées à l'alimentation humaine et animale.

On voit donc que le risque d'ingérer des denrées contaminées est réel dans de nombreux pays. Après son ingestion, l'OTA est principalement absorbée au niveau de la partie proximale du jéjunum. Elle est fixée à 90% par les protéines plasmatiques puis distribuée dans les reins, le foie et les muscles. Elle passe également dans le lait. Ces caractéristiques cinétiques expliquent qu'on puisse retrouver de l'OTA à l'état résiduel dans les viandes et dans les produits laitiers issus d'animaux contaminés. En plus de l'OTA, on peut également retrouver de l'OTá et de l'OH-OTA, métabolites considérés comme moins toxiques que le composé parental.

L'espèce animale la plus sensible à l'OTA est l'espèce porcine. En fonction de la durée de l'exposition et du niveau de contamination des aliments, on distingue deux formes d'ochratoxicose : une forme aiguë et une forme chronique. Chez les volailles, l'intoxication par l'OTA entraîne principalement des retards de croissance, elle augmente la sensibilité aux infections et se traduit par des pertes zootechniques. Chez les animaux de laboratoire, la toxicité chronique de l'OTA est dominée par son pouvoir carcinogène. Chez l'homme, les informations épidémiologiques disponibles indiquent que la Néphropathie Endémique des Balkans, une affection dont les manifestations cliniques et lésionnelles sont proches de l'ochratoxicose porcine, pourrait être liée à la consommation d'aliments contaminés par l'OTA. Cependant, à ce jour aucune relation de causalité n'a été établie de façon absolue.

L'étude des bases moléculaires de la toxicité de l'OTA montre qu'un des premiers effets de cette mycotoxine est d'inhiber spécifiquement la synthèse protéique au niveau post-transcriptionnel. Cette action, associée à une interaction avec les transporteurs des anions, pourrait expliquer le pouvoir néphrotoxique de l'OTA. Toutefois ce mécanisme d'action n'est pas le seul incriminé. De nombreuses équipes ont mis en évidence la génotoxicité de l'OTA qui entraîne la formation d'adduits à l'ADN. On peut donc dire que les effets toxiques les plus à craindre de l'OTA sont sa néphrotoxicité lors d'intoxication aiguë ou subaiguë et son pouvoir carcinogène lors d'exposition chronique à faible dose. Ce dernier aspect posant le problème d'établissement d'une DJA chez l'homme. En ce qui concerne les niveaux de contamination en France, différentes données permettent de penser que le risque chez l'animal peut être considéré comme mineur alors que le risque chez l'homme ne peut pas être complètement ignoré. La lutte est alors avant tout prophylactique : elle a pour but de limiter la contamination des aliments par des moisissures toxino-gènes, en effet les méthodes de décontamination en mycotoxines ne donnent que des résultats partiels ou aléatoires.

Ainsi, le rôle du vétérinaire, en France, est de bien connaître la toxicité de l'OTA pour pouvoir informer du risque que représente cette mycotoxicose. Bien que le risque de manifestation clinique soit mineur dans notre pays, la contamination des aliments du bétail peut entraîner la persistance des résidus dans les viandes et produits dérivés destinés à l'alimentation humaine. On recommandera donc de ne pas distribuer les aliments les plus contaminés aux animaux destinés à la consommation humaine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALBASSAM, M.A., YONG, S.I., BHATNAGAR, A.K., SHARMA, A.K. & PRIOR, M.G. (1987).- Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats.-*Vet.Pathol.*, **24**, 427-435.
- [2] APPELGREN, L.E. & ARORA, R.G. (1983a).- Distribution of 14 C-labelled ochratoxin A in pregnant mice.- *Food Chem. Toxicol.*, **21**, 563-568.
- [3] APPELGREN, L.E. & ARORA, R.G. (1983b).- Distribution studies of 14 C-labelled aflatoxin B1 and ochratoxin A in pregnant mice.- *Vet. Res. Commun.*, **7**, 141-144.
- [4] ARORA, R.G. & FRÖLEN, H. (1981).- Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. 2. Ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of gestation. *Acta Vet. Scand.*, **22**, 535-552.
- [5] AUFRAY, Y. & BOUTIBONNES, P. (1986).- Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using E.coli, in the SOS spot test.- *Mut.Res.*, **171**, 79-82.
- [6] AZEMAR, B. (2000).- Etude du rôle de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanisme moléculaire impliqué.- Thèse universitaire, Toulouse.
- [7] BAHNEMANN, E., KERLING, H.-P., ENSMINGER, S., SCHWERDT, G., SILBERNAGL, S. & GEKLE, M. (1997).- Renal transepithelial secretion of ochratoxin A in the non filtering toad kidney. - *Toxicology*, **120**, 11-17.
- [8] BALLINGER, M.B., PHILLIPS, T.D. & KUBENA, L.F. (1986).- Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the pregnant rat.1. *Food Safety*, **8**, 11-24.
- [9] BARNIKOL, H. & THALMANN, A. (1988).- Klinische Beobachtungen beim Schein in Zusammenhang mit den Mykotoxinen Ochratoxin A und Zearalenon.- *Tierarztl. Umsch.*, **43**, 74-82.
- [10] BAUDRIMONT, I., BETBEDER, A.M. & CREPPY, E.E. (1997) Prevention of toxic effects of ochratoxin A, a natural contaminant of mouldy food and feed : effect of a A19 (structural analogue of phenylalanine), on the nephrotoxicity in rats and on the inhibition of protein synthesis in Vero cells.- *Chem. Biol. Interactions*, **104**, 29-40.
- [11] BAUER, J., NIEMIEC, J. & SCHOLTYSSSEC, S. (1988).- Ochratoxin A im legehennen futter. 2. Mitteilung : Rückstände in serum, leber und ei. *Arch. Geflügelkd*, **52**, 71-75.
- [12] BEGUM, F. & SAMAJPATI, N. (2000).- Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds.- *Naturwissenschaften*, **87**, 275-277.
- [13] BELMADANI, A., STEYN, P.S., TRAMU, G., BETBEDER, A.M., BAUDRIMONT, I. & CREPPY, E.E. (1999).- Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions.- *Arch.Toxicol.*, **73**, 108-114.
- [14] BERNDT, W.O. & HAYES, A.W. (1979).- *In vivo* and *in vitro* changes in renal function caused by ochratoxin A in the rat.- *Toxicology*, **12**, 5-17.
- [15] BOORMAN, G.A., HONG, H.L., DIETER, M.P., HAYES, H.T., POHLAND, A.E., STACK, M. & LUSTER M.I. (1984).- Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**, 304-312.
- [16] BORDAS, E., BRETTER, E., COSTIN, L. & LENGHEL, I (1973).- Etude épidémiologique de la néphropathie.- *Rev. Epidem., Méd. soc. et Santé Publ.*, **21**, 481-498.

- [17] BOTTON, A., FEVRE, M., GAUTHIER, S., GUY, P., LARPENT, J.-P., REYMOND, P., SANGLIER, J.J., VAYSSIER, Y., & VEAU, P. (1990).- moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle.- 2eme édition revue et complétée.- MASSON
- [18] BREITHOLTZ-EMANUELSON, A., PALMINGER-HALLEN, I., WOHLIN, P.O., OSKARSSON, A., HULT, K. & OLSEN, M. (1993a).- Transfert of ochratoxin A from lacting rats to their offspring's : a short-term study.- *Natural Toxins*, **I**, 347-352.
- [19] BREITHOLTZ-EMANUELSON, A., OLSEN, M., OSKARSSON, A., PALMINGER, I. & HULT, K. (1993b).- Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding blood samples.6 *JAOAC. Inter.*, Vol **76**, 842-846.
- [20] BRUININK, A., RASONYI, T. & SIDLER, C. (1997).- Reproduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. *In vitro* effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures.- *Toxicology*, **118**, 205-210.
- [21] BRYDEN, W.L. (1998).- Mycotoxin Contamination of Australian Pastures and Feedstuffs In : Toxic plants and other natural toxicants. Edited by Garland, T. & Barr, C. CAB international. 464-466. Wallington (GBR). 585p, 1 vol.
- [22] BURDITT, S., HAGLER, W.M., HAMILTON, P.B. (1984) Feed refusal during ochratoxicosis in Turkeys. *Poultry Science*, **63**, 2172-2174.
- [23] BURNS, R.B. & MAXWELL, M.H. (1987).- Ochratoxicosis A in young Khabi Campbell duclings.- *Res. Vet. Sci*, **42**, 395-403.
- [24] CANET, C. (1999).- réglementation mondiale dans : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque, chapitre 16, Lavoisier, Tec & Doc., Paris, 409-428.
- [25] CAST (1989).- Mycotoxins, economic and health risks. Task force report No**116**.- Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA.
- [26] CASTEGNARO, M., BAREK, J., FRÉMY,J.-M., LAFONTAINE, M., MIRAGLIA, M., SANSONE, E.B. & TELLING, G.M. (1991).- Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some mycotoxins. IARC Scientific Publications No.**113**, Lyon, International Agency for Research on Cancer, p.63.
- [27] CASTEGNARO, M., MOHR, U., PFOHL-LESZKOWICZ, A., ESTEVE, J., STEINMANN, J., TILMANN, T., MICHELON, J. & BARTSCH, H. (1998).- Sex and Strain specific induction of renal tumours by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int. J. Cancer*, **77**, 70-75.
- [28] CASTEGNARO, M. (1999).- Risques cancérogènes dans : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque, chapitre 5, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 121-140.
- [29] CHERNOZEMSKY, I.N., STOYANOV, I.S., PETKOVA-BOCHAROVA, T.K., NICOLOV, I.G., DRAGANOV, I.G., STOICHEV, I., TANCHEV, Y., NAIDENOV, D. & KALCHEVA, N.D. (1977).- Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district.- Bulgaria. *Int. J. Cancer.*, **19**, 1-11.
- [30] CHU, F.S. (1971).- Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 359-366.
- [31] CHU, F.S. (1974).- A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1105-1113.
- [32] COOK, W.O., OSWEILER, G.D., ANDERSON, T.D. & RICHARD, J.L. (1986).- Ochratoxicosis in Iowa swine.- *Journal of the american veterinary medical association*. Vol 188, N°**12**, 1399-1402
- [33] CREPPY, E.E., LUGNIER, A.A.J., FASIOLO, F., HELLER, K., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1979).- In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A.- *Chem.Biol. Interact.*, **24**, 257-262.

- [34] CREPPY, E.E., LORKOWSKI, G., BECK, G., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1980a).- Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells.- *Toxicol. Lett.*, **5**, 375-380.
- [35] CREPPY, E.E., SCHEGEL, M., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1980b).- Phenylalanine prevents acute poisoning by ochratoxin A in mice.- *Toxicol. Lett.*, **6**, 77-80.
- [36] CREPPY, E.E., LORKOWSKI, G., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1982).- Kinetics of the immunosuppressive action of ochratoxin A on mice. In : Proceedings, V International IUPAC Symposium Mycotoxins and Phytotoxins, September 1-3, 1982, Vienna, 289-292. Austrian Chem. Soc., Vienna.
- [37] CREPPY, E.E., KERN, D., STEYN, P.S., VLEGGAR, R., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1983a).- Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells.- *Toxicol.Lett.*, **19**, 217-222.
- [38] CREPPY, E.E., STORMER, F.C., KERN, D., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1983b).- Effect of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-A synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells.- *Chem. Biol. Interact.*, **47**, 239-247.
- [39] CREPPY, E.E., ROSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1984).- Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine.- *Food Chem. Toxicol.*, **22**, 883-886.
- [40] CREPPY, E.E., KANE, A., DIRHEIMER, G., LAFARGE-FRAYSSINET, C., MOUSSET, S. & FRAYSSINET, C. (1985).- Genotoxicity of ochratoxin A in mice, DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney.- *Toxicol.Lett.*, **28**, 29-35.
- [41] CREPPY, E.E., CHAKOR, K., FISHER, M.J. & DIRHEIMER, G. (1990).- The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo.- *Arch.Toxicol.*, **64**, 279-284.
- [42] CREPPY, E.E., CASTEGNARO, M., GROSSE, Y., MERIAUX, J., MANIER, C. & MONTCHARMONT, P. (1993).- Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France : Alsace, Aquitaine et région Rhône Alpes.- In : Human ochratoxicosis and its pathologies, Creppy, E.E., Castegnaro, M. & Dirheimer, G.- INSERM/John Libbey Eurotext, **231**, 147-158.
- [43] CREPPY, E.E., BAUDRIMONT, I. & BETBEDER, A.-M. (1995).- Ochratoxines et conséquences en toxicologie.- *Cryptogamie Mycol.* 1995, **16** (3) : 195-221.
- [44] CUERO, R.G. & SMITH, J.E. (1987).- Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains.- *Trans. Br. Mycol. Soc.* , **2**, 221-226.
- [45] DEGEN, G.H., GERBER, M.M., OBRECHT, S., PFOHL-LESZHOWICZ, A. & DIRHEIMER, G. (1994).- Genotoxicity and cytotoxicity of ochratoxin A in ovine seminal vesicle cells cultures.- *Archives of Pharmacology*, **349**, 121 (Abstract).
- [46] DEGEN, G.H., GERBER, M.M., OBRECHT-PFLUMIO, S. & DIRHEIMER, G. (1997).- Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cells. *Arch. toxicol.*, **71**, 365-371.
- [47] DERACHE, R. & DERACHE, P. (1986).- Toxicité des champignons.- In : Derache, R.- Toxicologie et sécurité des aliments - Tec & Doc., Lavoisier. 205-225.
- [48] D'MELLO, J.P.F. & MACDONALD, A.M.C. (1997).- Mycotoxins.- *Animal Feed Science Technology*, **69**, 155-166.
- [49] DOERR, J.A. & REED, J.B. (1984).- Renal function in broiler chickens during ochratoxicosis and citrinin toxicosis.- *Poultry Science*, **63** : suppl.1, 92.

- [50] DORRENHAUS, A. & FOLLMAN, W. (1997).- Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells.- Arch. Toxicol., **71**, 709-713.
- [51] DOSTER, R.C., SINNHUBER, R.O., WALES, J.H. & LEE, D.J. (1971).- Acute toxicity and carcinogenicity of ochratoxin A in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).- Fed.Proc, **30**, 578.
- [52] DRAGACCI, S. & FRÉMY, J.-M. (1999).- Techniques analytiques pour la recherche des mycotoxines dans les aliments dans : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque, chapitre 7, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 141-169.
- [53] DWIDEDI, R. & BURNS, R.B. (1984a).- Pathology of ochratoxicosis in young broiler chicks.- Research in Veterinary Science, **36** : 92-103.
- [54] DWIDEDI P., BURNS, R.B. (1984b).- Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks.- Res. In Vet. Sci. **36**, 117-121.
- [55] DWIDEDI, P., BURNS, R.B., MAXWELL, M.H. (1984c).- Ultrastructural study of the liver and kidney in ochratoxicosis A in young broiler chicks.- Research in Veterinary Science, **36**, 104-116.
- [56] DWIDEDI, P. & BURNS, R.B. (1984d).- The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry.- A review. Part I. Epidemiology and toxicity.
- [57] EHC 105 *Ochratoxins*
- [58] EL ADLOUNI, C., PINELLI, E., AZÉMAR, B., ZAOUI, D., BEAUNE, P. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (2000).- Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A : role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase.- Environmental and Molecular Mutagenesis, **35**, 123-131.
- [59] ELLING, F., HALD, B., JACOBSEN, C. & KROGH, P. (1975).- Spontaneous cases of toxic nephropathy in poultry associated with Ochratoxin A.- Acta Path. Micro. Sc. Section A, **83**, 739-741.
- [60] ELLING, F. (1979a).- Enzyme histochemical studies of ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy. (abstract).- In : 6th International Symposium Animal. Plant. Microbial. Scand., **87**, 237-243.
- [61] ELLING, F. (1979b).- Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy : alterations in enzyme activity in tubular cells.- Acta Pathol. Microbiol. Scand., **87**, 237-243.
- [62] ELLING, F. (1983).- Feeding experiments with ochratoxin A-contaminated barley to bacon pigs IV renal lesions.- Acta.Agric. Scand., **33**, 153-159.
- [63] ELLING, F., NIELSEN, J.P., LILLEHOJ, E.B., THOMASSEN, M.S. & STORMIER, F. (1985).- Ochratoxin A induced porcine nephropathy : enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure.- Toxicol., **23**, 247-254.
- [64] ENDOU, H., KOSEKI, C., YAMADA, H. & OBARA, T. (1986).- Evaluation of nephrotoxicity using isolated nephron segments.- Dev. Toxicol. Environ. Sci., **14**, 207-216.
- [65] ENDOU, H. (1998).- Recent advances in molecular mechanisms of nephrotoxicity.- Toxicology Letters, **102-103**, 29-33.
- [66] FUCHS, R., RADIC, B., PERAICA, M., HULT, K. & PLESTINA, R. (1988).- Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats.- Period.Biol., **90**, 39-42.
- [67] FUKUI, Y., HOSHINO, K., KAMEYANA, Y., YASVI, T., TODA, C. & NAGANO, H. (1987).- Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain.- Food Chem. Toxicol., **25**, 17-24.
- [68] GALTIER, P. (1974a).- Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme vivant. I. Transport sanguin de la toxine chez le rat. Ann. Rech. Vet., **5**, 311-318.

- [69] GALTIER, P. (1974b).- Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal.II. Distribution et élimination chez le rat. *Ann. Rech.Vet.*, **5**, 319-328.
- [70] GALTIER, P. (1978).- Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology-ochratoxin A.- *Vet. Sci. Commun.*, **1**, 349-358.
- [71] GALTIER, P., CHARPENTEAU, J.L., ALVINERIE, M. & LABOUCHE, C. (1979).- The pharmacokinetic profiles of ochratoxine A in the rat after oral and intravenous administration.- *Drug Metabol. Dispos.* **7**, 429-434.
- [72] GALTIER, P., CAMGUILHEM, R. & BODIN, G. (1980).- Evidence for in vitro and in vivo interaction between ochratoxin A and three acidic drugs.- *Food Cosmet. Toxicol.*, **18**, 493-496.
- [73] GALTIER, P., ALVINERIE, M. & CHARPENTEAU, J.L. (1981).- The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens.- *Food Cosmet.Toxicol.*, **19**, 735-738.
- [74] GALTIER, P., LARRIEU, G. & ALVINERIE, M. (1993).- Influence de l'ochratoxine A sur le devenir des xénobiotiques. In : *Human ochratoxicosis and its pathologies.*, Creppy, E.E., Castegnaro, M., Dirheimer, G., Eds. John Libbey, Eurotext, **231**, 59-65.
- [75] GEKLE, M., SILBERNAGL, S., MILDENBERGER, S. & FREUDINGER, R. (1993a).- Effect on dome formation and uptake of ochratoxin A in proximal tubule-derived opossum kidney cell monolayers.- *Cell.phys.Biochem.*, **3**, 68-77.
- [76] GEKLE, M. & SILBERNAGL, S. (1993b).- Mechanism of ochratoxin A-induced reduction of glomerular filtration rate in rats.- *J. Pharmacol. Exp.Ther.*, **267**, 316-321.
- [77] GEKLE, M., OBERLEITHNER, H. & SILBERNAGL, S. (1993c).- Ochratoxin A impairs postproximal nephron function in vivo and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-Darby canine kidney cells in vitro.- *Pflugers Arch.*, **425**, 401-408.
- [78] GEKLE, M., SAUVANT, C., SCHERDT, G. & SILBERNAGL, S. (1998).- Tubulotoxic Mechanisms of Ochratoxin A.- *Kidney Blood Press Res.*, **21**, 277-279.
- [79] GROENE, E.M., JAHN, A., HORBACH, G.J. & FINK-GREMMELS, J. (1996).- Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A.- *Env. Toxicol. And Pharmacol.*, **1**, 21-26.
- [80] GROSSE, Y., BAUDRIMONT, I., CASTEGNARO, M., BETBEDER, A.-M., CREPPY, E.E., DIRHEIMER, G. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1995a).- Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cell.- *Chem. Biol. Interactions*, **95**, 175-187.
- [81] GROSSE, Y., CASTEGNARO, M., MACÉ, K., BARTSCH, H., DIRHEIMER, G., PINELLI, E., PFEIFER, A. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1995b).- Evaluation of ochratoxin A genotoxicity by DNA-adducts detection: cytochromes P450 implicated.- *Clin. Chem.*, **12**, 1927-1929.
- [82] GROSSE, Y., MONJE, M.C., MACÉ, K., PFEIFER, A. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1997a).- Use of bronchial epithelial cells expressing human cytochrome P450 for study on metabolism and genotoxicity of ochratoxin A.- *In vitro Toxicology*, **10**, 97-106.
- [83] GROSSE, Y., CHEKIR-GHEDIRA, L., HUC, A., OBRECHT-PFLUMIO, S., DIRHEIMER, G., BACHA, H. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1997b).- Retinol, ascorbic acid and á tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer letters*, **114**, 225-229.
- [84] GROVES, C.E., MORALES, M. & WRIGHT, S.H. (1998).- Peritubular transport of ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules.- *J. Pharmacol. Expr.Therap.*, **284**, 943-948.

- [85] GUERRE, P. (2000).- Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination des aliments du bétail par des mycotoxines.- Revue Méd. Vét., **12**, 1095-1106.
- [86] HAGELBERG, S., FUCHS, R. & HULT, K. (1989).- Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma binding properties.- J. Appl. Toxicol., **9**, 91-96.
- [87] HÄGGBLUM, P.E. & GHOSH, J. (1985).- Post harvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels.- Appl. Environ. Microbiol., **49**, 787-790.
- [88] HAMILTON, P.B., HUFF, W.E. & HARRIS, J.R. (1977).- Field episodes of ochratoxicosis in poultry.- Poultry Science, **56** :5, 1719.
- [89] HAMILTON, P.B., HUFF, W.E., HARRIS, J.R. & WYATT, R.D.(1982).- Natural occurrences of ochratoxicosis in Poultry.- Poultry Science **61**, 1832-1841.
- [90] HANSEN, C.E., DUELAND, S., DREVON, C.A. & STORMER, F.C. (1982).- Metabolism of ochratoxin A by primary cultures of rat hepatocytes. Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1267-1271.
- [91] HARRIS, J.P. & MANTLE, P.G. (2001).- Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*.- Phytochemistry, **58**, 709-716.
- [92] HATEY, F. & GALTIER, P. (1977).- Toxicité à court terme de l'ochratoxine A chez le rat ; quelques manifestations biochimiques de l'intoxication.- Ann. Rech. Vét., **8**, 7-12.
- [93] HARVEY, R.B., KUBENA, L.F., NAQI, S.A., GYIMAH, J.E., CORRIER, D.E., PANIGRAHY, B. & PHILLIPS, T.D. (1987).- Immunologic effects of low levels of ochratoxin A in ovo : utilization of a chicken embryo model. Avian Dis., **31**, 787-791.
- [94] HARVEY, R.B., HUFF, W.E., KUBENA, L.F. & PHILLIPS, T.D. (1989).- Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs.- Am. J. Vet. Res., **50**, 1400-1405.
- [95] HARWIG, J., KUIPER-GOODMAN, T. & SCOTT, P.M. (1983).- Microbial food toxicants : Ochratoxins in : Handbook of foodborne diseases of biological origin. (M.Recheigl,ed), CRC press, Boca Raton, FL, USA, 193-338.
- [96] HELLER, K. & RÖSCHENTHALER, R. (1977).- Quelques résultats sur l'inhibition des fonctions cellulaires par l'ochratoxine A sur *Streptococcus faecalis* In : Larcan, A. & Lambert, H., eds, Mycotoxines, Paris, Masson, 35-42.
- [97] HENNING, A., FINKS-GREMMELS, J. & LEISTNER, L. (1991).- Mutagenicity and effects of Ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In : Castegnaro, M., Plëstina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H., eds. Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC Scientific Publications No**115**, IARC, Lyon, pp.225-260.
- [98] HÖHLER, D. (1998).- Ochratoxin A in food and feed : occurrence, legislation and mode of action.- Z.Ernährungswiss, **37**, 2-12.
- [99] HÖHLER, D., SUDEKUM, K.H., WOLFFRAM, S., FROHLICH, A.A. & MARQUARDT, R.R. (1999).- Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep.- J. of Animal Science, **77** : 5, 1217-1223.
- [100] HOLLINGER & EKPERIGIN, H.E. (1999).- Mycotoxicosis in food producing animals.- Food animal practice, vol. **15**, N°1.
- [101] HOLMBERG, T., BREITHOLTZ, A. BENGTESSON, A. & HULT, K. (1990a).- Ochratoxin A in swine blood in relation to moisture content in feeding barley at harvest.- Acta Agric.Scand., **40**, 201-204.
- [102] HOLMBERG, T., HAGELBERG, S., LUNDEHEIM, N., THAFVELIN, B. & HULT, K. (1990b).- Ochratoxin A in swine blood used for evaluation of cereal handling procedures.- J. Vet. Med. B. **37**, 97-105.

- [103] HOLMBERG, T., BREITHOLTZ-EMANUELSON, A., HAGGBLOM, P., SCHAN, O. & HULT, K. (1991).- *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds.- *Mycopathologia*, **116**, 169-176.
- [104] HONG, H.H.L., JAMESON, C.W. & BOORMAN, G.A. (1988).- Residual haematopoietic effect in mice exposed to ochratoxin A prior to irradiation.- *Toxicology*, **53**, 57-67.
- [105] HUFF, W.E., DOERR, J.A. & HAMILTON, P.B. (1977).- Decreased bone strength during ochratoxicosis and aflatoxicosis.- *Poultry Science*, **56** : 5, 1724.
- [106] HUFF, W.E., CHANG, C.F., HAMILTON, P.B. (1978).- The anemia and leucopenia during ochratoxicosis in broiler chickens.- *Poultry Science*, **57** : 4, 1146..
- [107] HUFF, W.E., KUBENA, L.F. & HARVEY, B. (1988).- Progression of ochratoxicosis in broiler chickens.- *Poultry Science*, **67**, 1139-1146.
- [108] HULT, K., TEILING, A. & GATENBECK, S. (1976).- Degradation of ochratoxin A by a ruminant.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 443-444.
- [109] HULT, K., RUTQVIST, L., HOLMBERG, T., THAFVELIN, B. & GATENBERG, S. (1984).- Ochratoxin A in blood of slaughter pigs.- *Nord.Vet.-Med.*, **36**, 314-316.
- [110] HUMPHREYS, D.J. (1988).- Nephrotoxins : Ochratoxin In : *Veterinary Toxicology*, 3rd edition, 294-295, 356p, edit : Bailliere Tindall, London (GBR).
- [111] HUTCHINSON, R.D. & STEYN, P.S. (1971).- The isolation and stucture of 4-hydroxyochratoxin A and 7-carboxy-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin from *Penicillium viridicatum*.- *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4033-4036.
- [112] IARC (1983).- International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances : food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume **56**, IARC, Lyon.
- [113] IARC (1993). International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances : food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume **56**, IARC, Lyon.
- [114] JORGENSEN, K. (1998).- Survey of pork, poultry, coffee, bier and pulses for ochratoxin A.- *Food Addit. Contam.*, **13**, 95-104.
- [115] JUNG, K.Y. & ENDOU, H. (1989).- Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **100**, 383-390.
- [116] KANE, A., CREPPY, E.E., ROTH, A., RÖSCHENTHALER, R. & DIRHEIMER, G. (1986).- Didttribution of the [3H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys.- *Arch. Toxicol.*, **58**, 219-224.
- [117] KANISAWA, M., SUZUKI, S., KOZUKA, Y. & YAMAZAKI, M. (1977).- Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats 1. Acute oral toxicity.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 55-64.
- [118] KANISAWA, M., SUZUKI, S. & MOROI, K. (1979).- Ochratoxin-alpha, is it an inducing factor of acute enteritis by ochratoxin A ? In : 6th International Symposium Animal, Plant, Microbial Toxins, Uppsala, Sweden.
- [119] KANISAWA, M., SUZUKI, S. & MOROI, K. (1990).- The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats.- *JEPTO*, **10**, 56-63.
- [120] KERKADI, A., BARRIAULT, C., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A., YOUSSEF, I.M., ZHU, X.X. & TUCHWEBER, B. (1999).- Cholestyramine protection against Ochratoxin A toxicity : role of Ochratoxin A absorption by the resin and bile acid enterohepatic circulation.- *J. Food Protection*, **62**, 1461-1465.

- [121] KHAN, S., MARTIN, M. BARTSCH, H. & RAHIMTULA, A.D. (1989).- Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A.- *Biochem.Pharmacol.*, **38**, 67-72.
- [122] KIESSLING, K. H., PETTERSON, H., SANDHOLM, K. & OLSEN, M. (1984).- Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 1070-1073.
- [123] KITCHEN, D.N., CARLTON, W.W. & HINSHAMAN, E.J. (1977a).- Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs III. Terminal renal ultrastructural alterations.- *Vet. Pathol.*, **14**, 392-406.
- [124] KITCHEN, D.N., CARLTON, W.W. & TUIITE, J. (1977b).- Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Vet. Pathol.*, **14**, 154-172.
- [125] KITCHEN, D.N., CARLTON, W.W. & TUIITE, J. (1977c).- Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs.II . Pathology.- *Vet. Pathology.*, **14**, 261-272.
- [126] KONRAD, I. & RÖSCHENTHALER, R. (1977).- Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A.- *FEBS Lett.*, **83**, 341-347.
- [127] KROGH, P., HALD, B. & PEDERSEN, E.J. (1973).- Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy.- *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B*, **81**, 689-695.
- [128] KROGH, P., AXELSEN, N. H., ELLING, F., GYRD-HANSEN, N., HALD, B., HYLDEGAARD-HENSEN, J., LARSEN, A.E., MADSEN, A., MORTENSEN, H.P., MÖLLER, T., PETERSEN, O.K., RAVINSKOV, U., ROSTGAARD, M. & AALUND, O. (1974).- Experimental porcine nephropathy changes of renal function and structure induced by Ochratoxin A-contaminated feed.- *Acta Pathol. and Microbiol. Scand., Section A, Suppl.*, **246**, 1-21.
- [129] KROGH, P. & ELLING, F. (1977).- Mycotoxic nephropathy.- *Vet. Sci. Commun.*, **1**, 51-3.
- [130] KROGH, P. (1978).- Causal associations of mycotoxic nephropathy.- *Acta Pathol. Microbiol. Scandi., section A, suppl.* **269**, 1-28.
- [131] KROGH, P. (1987).- Ochratoxin A in Food. New York, Academic Press, 97-121.
- [132] KROGH, P., GYRD-HANSEN, N., HALD, B.; LARSEN, S., NEILSEN, J.P., SMITH, M.; IVANOFF, C. & MEISNER, H. (1988).- Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy : diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity.- *J. Toxicol. Environ. Health*, **23**, 1-14.
- [133] KUBENA, L. F., HARVEY, R. B., FLETCHER, O. J., PHILLIPS, T. D., MOLLENHAUER, H. H., WITZEL, D. A. & HEIDELBAUGH, N. D. (1985).- Toxicity of ochratoxin A and Vanadium to Growing Chicks.- *Poultry Science*, **64**, 620-628
- [134] KUCZUK, M. H., BENSON, P. M., HEALTH, H. & HAYES, W. (1978).- Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*.- *Mutat.Res.*, **53**, 11-20.
- [135] KUIPER-GOODMAN, T.& SCOTT, P.M. (1989).- Risk assesment of the mycotoxin ochratoxin A.- *Biomed.Environ.Sci.*, **2**, 179-248.
- [136] KUMAGAI, S. & AIBARA, K. (1982).- Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **64**, 94-102.
- [137] KUMAGAI, S. (1985).- Ochratoxin A : plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats.- *Food Chem. Toxicol.*, **26**, 753-758.

- [138] KURAMOCHI, G., GEKLE, M. & SILBERNAGL, S. (1997).- Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney : increases in pH and HCO₃⁻ in the tubules and vasa recta.- Eur. J. Physiol., **434**, 392-397.
- [139] LEE, H. B. & MAGAN, N. (2000).- Impact of environment and interspecific interactions between spoilage fungi and *Aspergillus ochraceus* on growth and ochratoxin production in maize grain.- Int. J. of Food Microbiol., **61**, 11-16.
- [140] LI, S., MARQUARDT, R.R. & FROHLICH, A.A. (2000).- Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine of rats.- Food Chem.Toxi., **38**, 141-152.
- [141] LILLEHOJ, E.B., KWOLEK, W.F., ELLING, F. & KROGH, P. (1979).- Tissue distribution of radioactivity from ochratoxin A-[¹⁴C]in rats.- Mycopathologia, **68**, 175-177.
- [142] LOPEZ-GARCIA, R., PARK, D.L. & GUTIERREZ DE ZUBIOURE (1999) Procédés pour réduire la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires.- In : Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque .- Chapitre 15, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 394-403.
- [143] LUSTER, M.I., GERMOLEC, D.R., BURLESON, G.R., JAMESON, C.W., ACKERMANN, M.F., LAMM, K.R. & HAYES, H.T. (1987).- Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A.- Cancer Res., **47**, 2259-2263.
- [144] MACDONALD, S., WILSON, P., BARNES, K., DAMANT, A., MASSEY, R., MORTHY, E. & SHEPHERD, M.J. (1999).- Ochratoxin A in dried vine fruit : method development and survey.- Food Additives and Contaminants, **16** (6), 253-260.
- [145] MADHYASTHA, S.M., MARQUARDT, R.R., FROLICH, A.A., PLATFORD, G. & ABRAMSON, D. (1990).- Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*.- J. Agric. Food. Chem., **38**, 1506-1510.
- [146] MADSEN, A., MORTENSEN, H.P. & HALD, B. (1982a).- Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pig performance and residues.- Acta Agric. Scand., **32**, 225-229.
- [147] MADSEN, A., HALD, B., LILLEHOJ, E. & MORTENSEN, H.P. (1982b).- Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. II. Naturally contaminated barley given for 6 weeks from 20 kg compared with normal barley supplemented with crystalline ochratoxin A and/or citrinin.- Acta.Agric. Scand., **32**, 369-372.
- [148] MAJERUS, P., BRUN, G. & BARTSCH, H. (1991).- Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in E. Coli stains, studies on their mode of actions. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch H., eds, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC Scientific Publs. N°**115**, IARC, Lyon, 261-266.
- [149] MALAVEILLE, C., BRUN, G. & BARTSCH, H. (1991).- Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in E .Coli strains, studies on their mode of actions. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H. eds, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC. Scientific Publs. No**115**, IARC, Lyon, 261-266.
- [150] MALAVEILLE, C., BRUN, G. & BARTSCH, H. (1994).- Structure-activity studies in E.coli strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive metabolites.- Mutat. Res., **307**, 141-147.

- [151] MANOLOV, G., MANOLOVA, Y., CASTEGNARO, M. & CHERNOZEMSKY, I.N. (1991).- Chromosomal alterations in lymphocytes of patients with Balkan endemic nephropathy and of healthy individuals after incubation *in vitro* with ochratoxin A. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H. eds, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC. Scientific Publ. No**115**, IARC, Lyon, 267-272.
- [152] MANOLOVA, Y., MANOLOV, G., PARVANOV, L., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CASTEGNARO, M. & CHERNOZEMSKY, I.N. (1990).- Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly X-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat. Res.*, **231**, 143-149.
- [153] MARESCA, M., MAHFAUD, R., PFOHL-LESZKOWICZ, A. & FANTINI, J. (2000).- Toxicité de l'ochratoxine A sur les cellules épithéliales intestinales Caco-2 et HT-29-D4: diminution de la résistance trans-épithéliale et inhibition de l'activité du co-transporteur Na⁺/glucose.- Communication orale, 4^{ème} réunion des centres de recherche en Nutrition humaine, 12-13 octobre 2000, Marseille.
- [154] MAXWELL, M.H. & BURNS, R.B. (1987).- Ultrastructural study of ochratoxicosis in quail (*Coturnix coturnix japonica*).- *Res. in Vet. Sci.*, **42**, 228-231.
- [155] MEISSNER, H. & CHAN, S. (1974).- Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport system.- *Biochemistry*, **23**, 2745-2800.
- [156] MEISSNER, H. & SELENIK, P. (1979).- Inhibition of renal gluconeogenesis in rats by ochratoxin.- *Biochem. J.*, **180**, 681-690.
- [157] MEISSNER, H., CIMBALA, M. A., & HANSON, R. W. (1983).- Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly(A) RNA level by ochratoxin A.- *Arch. Biochem. Biophys.*, **223**, 264-272.
- [158] MEISSNER, H. & CIMBALA, M. (1986a).- Effect of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys. In : Chamber, P.L., Gehring, P. & Sukai, K., eds. *New concepts and Developments in Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, 261-267.
- [159] MEISSNER, H. & KROGH, P. (1986b).- Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxine A induced nephropathy.- *Dev. Toxicol. Environ. Sci.*, **14**, 199-206.
- [160] MICCO, C., MIRAGLIA, M., ONORI, R., IOPPOLO, A. & MANTOVANI, A. (1987).- Long term administration of low doses of mycotoxins in poultry. I. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens.- *Poultry Science*, **66**, 47-50.
- [161] MICCO, C., MIRAGLIA, M., BENELLI, L., ONORI, R., IOPPOLO, A. & MANTOVANI, A. (1988).- Long term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 2. Residues of ochratoxin A and aflatoxins in broilers and laying hens after combined administration of ochratoxin A and aflatoxin B1. *Food Addit. Contam.*, **5**, 309-314.
- [162] MISLIVEC, P.B. & TUIITE, J. (1970).- Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dentcorn kernels.-*Mycologia*, **62**, 75-88.
- [163] MOORE, J.H. & TRUELOVE, B. (1970).- Ochratoxin A : Inhibition of mitochondrial respiration.- *Science.*, **168**, 1102-1103.
- [164] MORÉ, J. & GALTIER, P. (1974).- Toxicité de l'ochratoxine A. I. Effet embryotoxique et tératogène chez le rat.- *Ann. Rech. Vet.*, **5**, 167-178.
- [165] MORI, H., KAWAI, K., OHBAYASHI, F., KUNIYASU, T., YAMAZAKI, M., HAMAZAKI, T. & WILLIAMS, G.M. (1984).- Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocytes primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes.- *Cancer Res.*, **44**, 2918-2923.

- [166] MOROI, K., SUZUKI, S., KUGOR, T., YAMAZAKI, M. & KANIZAWA, M. (1985).- Reduction of ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital.- *Toxicol Lett.*, **25**, 1-5.
- [167] MORTENSEN, H.P., HALD, B., LARSEN, A.E. & MADSEN, A. (1983a).- Ochratoxin A contaminated barleys for sows and piglets : Pig performances and residues in milk and pigs.- *Acta Agric. Scand.*, **33**, 349-352.
- [168] MORTENSEN, H.P., HALD, B. & MADSEN, A. (1983b).- Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 5. Ochratoxin A in pig blood.- *Acta Agric. Scand.*, **33**, 235-239.
- [169] MUNRO, I.C., MOODIE, C.A. KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M. & GRICE, H.C. (1974).- Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28**, 180-188.
- [170] NGAHA, E.O. (1985).- Biochemical changes in the rat during experimentally induced acute ochratoxicosis. *Enzyme*, **33**, 1-8.
- [171] OMAR, R.F., HASINOFF, B.B., MEJILLA, F. & RAHIMTULA, A.D. (1990).- Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxydation.- *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1183-1191.
- [172] OMAR, R.F. & RAHIMTULA, A.D. (1993).- Possible role of an iron-oxygen complex in 4(S)-4-hydroxyochratoxin formation by rat liver microsomes.- *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 2073-2081.
- [173] OMINSKI, R.H., MARQUARDT, R.R., SINHA, R.N. & ABRAMSON, D. (1994).- Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi.- In : Miller, J.D. & Trenholm, H.L.- *Mycotoxins in grain : compounds other than aflatoxin*.- Eagan Press, St Paul, USA, 287-312.
- [174] OSWEILER, G.D. & GALEY, F.D. (2000) *Toxicology.- The veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, vol 16, N°3, edit : W.B.Sounders Company, Philadelphia (USA).
- [175] OZPINARA, H., AUGONYTEB, G. & DROCHNERC, W. (1999).- Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system.- *Env. Tox. And Pharmacol.*, **7**, 1-9.
- [176] PAGE, R.K., STEWART, G., WYATT, R., BUSH, P., FLETCHER, O.J. & BROWN, J. (1980).- Influence of low levels of ochratoxin A on egg production, egg-shel stains, and serum uric-acid levels in Leghorn-type hens.- *Avian diseases*, vol.24, **3**, 777-780.
- [177] PASTER, N., LISKER, N. & CHET, I. (1983).- Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhlem, grown under controled atmospheres. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1136-1139.
- [178] PATTERSON, D.S.P., ROBERTS, B.A. & SMALL, B.J. (1976).- Metabolism of ochratoxins A and B in the pig during early pregnancy and the accumulation in body tissue of ochratoxin A only.- *Food Cosmet. Toxicol.*, **14**, 439-442.
- [179] PATTERSON, M. & DOMOGLU, A.P. (1986).- The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue.- *Lett. Appl. Microbiol.*, **3**, 123-128.
- [180] PERAICA, M., DOMIJAN, A.-M., MATASIN, M., LUCIC, A., RADIC, B., DELAS, F., HORVAT, M., BOSANAC, I., BALIJA, M., GRGICEVIC, D. (2001).- Variations of ochratoxin A concentration in the blood of healthy populations in some Croatian cities.- *Arch. Toxicol.*, **75**, 410-414.

- [181] PETKOVA-BOCHAROVA, T., STOICHEV, I., CHERNOZEMSKY, I.N., CASTEGNARO, M. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1998).- Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother.- *Env. And Molecular Mutagenesis*, **32**, 155-162.
- [182] PFOHL-LESZKOWICZ, A, CHAKOR, K., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1991).- DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. & Bartsch, H., eds, *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Sci. Publ. N° **115**, IARC, Lyon, 245-253.
- [183] PFOHL-LESZKOWICZ, A, GROSSE, Y., OBRECHT, S., KANE, A., CASTEGNARO, M., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1993a).- Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment by the mycotoxin ochratoxin A.- *Mutat. Res.*, **289**, 265-273.
- [184] PFOHL-LESZKOWICZ, A, GROSSE, Y., OBRECHT, S., KANE, A., CASTEGNARO, M., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1993b).- Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A exposure. I : Creppy, E.E., Castegnaro, M. & Dirheimer, G., eds. *Human Ochratoxicosis and its Pathologies*, vol **231**, John Libbey Eurotext Ltd., 199-207.
- [185] PFOHL-LESZKOWICZ, A, GROSSE, Y., CASTEGNARO, M., NIKOLOV, I.G., CHERNOZEMSKY, I. N., BARTSCH, H., BETBEDER, A.M., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1993c).- Ochratoxin A related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. In : Philips, D.H., Castegnaro, M. & Bartsch, H., eds. *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts*. IARC Sci. Publ., N°**124**, Lyon, 141-148.
- [186] PFOHL-LESZKOWICZ, A., OBRECHT, S., GROSSE, Y., DIRHEIMER, G. (1994).- Involvement of antioxydants and inhibitors of glutathione conjugaison in ochratoxin A genotoxicity in mice liver and kidney.- *Toxicol. Letters*, **74**, 64.
- [187] PFOHL-LESZKOWICZ, A, PINELLI, E., BARTSCH, H., MOHR, U. & CASTEGNARO, M. (1998).- Sex and Strain-Specific Expression of Cytochrome P450s in ochratoxin A-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity in Rats.- *Molecular Carcinogenesis*, **23**, 76-85.
- [188] PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1999a).- Ecotoxicogénèse In : *Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque* .- Chapitre 2, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 17-30.
- [189] PFOHL-LESZKOWICZ, A.& CASTEGNARO, M. (1999b).- L'ochratoxine A In : *Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque*.- Chapitre 9, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 249-267.
- [190] PFOHL-LESZKOWICZ, A., GUERRE, P. & GALTIER,P. (1999c).- Métabolisation des mycotoxines In : *Mycotoxines : Evaluation et gestion du risque*, chapitre 3, Lavoisier, Tec & Doc, Paris,46-50.
- [191] PINELLI, E., EL ADLOUNI, C., PIPY, B., QUARTULLI, F. & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (1999).- Roles of cyclooxygenase and lipooxygenase in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells.- *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **7**, 95-107.
- [192] PITOUT, M.J. (1969).- The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes.- *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1829-1836.
- [193] PITT, J.I. (1987).- *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 266-269.
- [194] POHLAND, A.E., NEISHEIM, S. & FRIEDMAN, L. (1992).- Ochratoxin A, a review.- *Pure Appl. Chem.*, **64**, 1029-1046.

- [195] PRIOR, M.G. & SISODIA, C.S. (1978).- Ochratoxicosis in White Leghorn Hens.- Poultry Sci., **57**, 619-623.
- [196] PRIOR M., G., SISODIA, C.S., O' NEIL, J.B. & HRUDKA, F. (1979).- Effect of ochratoxin A on fertility and embryo viability of japanese quail (*coturnix coturnix japonica*).- Can. J. Anim. Sci. **59**, 605-609.
- [197] PRIOR, M. G., O'NEIL, J.B. & SISODIA, C.S. (1980).- Effects of ochratoxin A on growth response and residues in broilers. Poult. Sci., **59**, 1254-1257.
- [198] PURCHASE, I.F.H. & VAN DER WATT, J.J. (1971).- The long term toxicity of ochratoxin A to rats.- Food Chem. Toxicol., **9**, 681-682.
- [199] RAMADEVI, V., NAIDU, N.R.G. & RAMAN, P.K.S. (1998).- Pathology of ochratoxicosis in broilers.- Indian J. Of Vet. Pathology, **22** : 2, 93-95.
- [200] RÖSCHENTHALER, R., CREPPY, E.E. & DIRHEIMER, G. (1984).- Ochratoxin A : On the mode of action of a ubiquitous mycotoxin.- J. Toxicol., **3**, 53-86.
- [201] ROTH, A., CHAKOR, K., CREPPY, E.E., KANE, A. (1988).- Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. Toxicology, **48**, 293-308.
- [202] ROUSSEAU, D.M., VAN PETEGHEM, C.H. (1989).- Spontaneous Occurrence of Ochratoxin A Residues in Porcine Kidneys in Belgium.- Bull. Environ. Contam. Toxicol., **42**, 181-186.
- [203] SCHEWRDT, G., FREUDINGER, R., SILBERNAGL, S. & GEKLE, M. (1999).- Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney.- Toxicology, **135**, 1-10.
- [204] SCOTT, P.M. & KANHERE, S.R. (1995).- Determination of ochratoxin A in beer.- Food Addit. Contamin., **12**, 591-598.
- [205] SCUDAMORE, K.A. & LIVESEY, C. (1998).- Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage : a review.- J. Sci. Food Agri. , **77**, 1-17.
- [206] SHALINI, M. (1996).- Studies on ochratoxin contamination and ochratoxicosis in rabbits.- PhD. Thesis, Bhavnagar University, Bhavnagar, India.
- [207] SINGH, J. & HOOD, R.D. (1985).- a protein deprivation enhances the teratogenicity of ochratoxin A in mice.- Teratology, **32**, 381-388.
- [208] SOKOL, P.P., RIPICH, G., HOLOHAN, D. & ROSS, C.R. (1988).- Mechanism of ochratoxin A transport in kidney. J. Pharmacol. Exp. Ther., **246**, 460-465.
- [209] SREEMANNARAYANA, O., FROHLICH, A.A., VITTI, T.G., MARQUARDT, R.R. & ABRAMSON, D. (1988).- Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves.- Anim. Sci., **66**, 1703-1711.
- [210] STEYN, P.S. & HOLZAPFEL, C.W. (1967).- The synthesis of ochratoxin A and B, metabolites of *Apergillus ochraceus*.- Wihl. Tetrahedron, **23**, 4449-4461.
- [211] STEYN, P.S. (1984).- In : Betina, V.- Mycotoxins : Production, Isolation, Separation and Purification.- Ed. Elsevier, Amsterdam, 183-216.
- [212] STOEV, S.D., HALD, B. & MANTLE, P.G. (1998).- Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology.- Veterinary record, **142**, 190-194.
- [213] STOEV, S.D. (2000).- Ultrastructural and antidote investigations into the experimental intoxication of chickens with ochratoxin A and penicillic acid.- Folia Veterinaria, vol **44**, No2.
- [214] STOEV, S.D., VITANOV, S., ANGUELOV, G., PETKOVA-BOCHAROVA, T. & CREPPY, E.E. (2001).- Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid.- Vet. Res. Communications, **25** : 3, 205-223.
- [215] STOJKOVIC, R., HULT, K., GAMULIN, S. & PLESTINA, R. (1984).- High affinity binding of Ochratoxin A to plasma constituents. Biochem. Int., **9**, 33-38.

- [216] STONARD, M.D., GORE, C. W., OLIVER, G.J.A. & SMITH, I.K. (1987).- Urinary enzymes and protein patterns as indicators of injury to different regions of the kidney.- *Fund. Appl. Toxicol.*, **9**, 339-351.
- [217] STOREN, O., HOLM, H. & STORMER, F.C. (1982).- Metabolism of ochratoxin A by rats.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 785-789.
- [218] STORMER, F.C., STOREN, O., HANSEN, C.E., PEDERSEN, J.L., HVISTENDAHL, G. & ASSEN, J. (1981).- Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 1051-1056.
- [219] STORMER, F.C., HANSEN, C.E., PEDERSEN, J.I. & ANSEN, J. (1983).- Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1183-1187.
- [220] STORMER, F.C., KOLSAKER, P., HOLM, H., ROGSTAD, S. & ELLING, F. (1985).- Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1108-1112.
- [221] STORMER, F.C. (1992).- Ochratoxin A. A mycotoxin of concern. In *Handbook of Applied Mycology*.- 403-432, Dekker, New York.
- [222] SUBRAMANIAN, S., KANTHASAMY, A., BALASUBRAMANIAN, N., SEKAR, N. & GOVINDASAMY, S. (1989).- Ochratoxin A toxicity on carbohydrate metabolism in rats.- *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **43**, 180-184.
- [223] SUJANI, G. & SRIRAMAN, P.K. (2000).- Pathology of ochratoxicosis in quails.- *Indian Journal of Animal Sciences*, **70**, 1120-1122.
- [224] SUZUKI, S., KOZUKA, Y., SATOH, T. & YAMAZAKI, M. (1975).- Studies on the nephrotoxicity of ochratoxin A in rats.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **34**, 479-490.
- [225] SUZUKI, S., MOROI, K., KANISAWA, M. & SATOH, T. (1977).- The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats.- *Japan. J. Pharmacol.*, **27**, 735-744.
- [226] SZCZECZ, G.M., CARLTON, W.W. & TUIE, J. (1973).- Ochratoxicosis in Domestic Swine.- *Toxicology and Applied Pharmacology*, **25** : 3, 456-457.
- [227] SZCZECZ, G.M., CARLTON, W.W. & HINSMAN, E.J. (1974).- Ochratoxicosis in Beagle dogs.- *Vet. Pathol.* : 385-406.
- [228] TRENK, H.L., BUTZ, M.E. & CHU, F.S. (1991).- Production of ochratoxin in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*.- *Appl. Microbiol.*, **21**, 1032-1035.
- [229] UENO, Y. & KUBOTA, K. (1976).- DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*.- *Cancer Res.*, **36**, 445-451.
- [230] UENO, Y. (1985).- Biotransformation of mycotoxins in the reconstituted cytochrome P-450 system.- *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, **22**, 28-30.
- [231] UMEDA, M., TSUTSUI, T. & SAITO, M. (1977).- Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins.- *Gann*, **68**, 619-625.
- [232] VALENTA, H. (1998).- Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids.- *J. of Chromatography A*, **815**, 75-92.
- [233] VAN DER MERWE, K. J., STEYN, P. S. & FOURRIE, L. (1965a).- Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolite of *Aspergillus ochraceus*.- *Nature*, **205**, 1112-1113.
- [234] VAN DER MERWE, K. J., STEYN, P. S., FOURRIE, L., SCOTT, D. B. & THERON, J. J. (1965b).- Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*.- *Wihl. J. Chem. Soc.*, 7083-7088.
- [235] VARGA, J., KEVEI, E., RIMYN, E., TEREN, J. & KAZAKIEWICZ, Z. (1996).- Ochratoxin production by *Aspergillus* species.- *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4461-4464.

- [236] VERMA, R.J. & SHALINI, M. (1998).- Hyperglycemia induced in rabbits exposed to ochratoxin.- *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **66**, 626-631.
- [237] VETERINARY CLINICAL TOXICOLOGY (1986).- BMK proceedings N°103. University of Sydney, Sydney (Aus). Cong.130.. 632p.
- [238] WEI, C.L., MARSHALL, M.R. & HSIEH, D.P. (1985).- Characterization of watersoluble glucuronide and sulphate conjugates of aflatoxin B1. Urinary excretion in monkey, rat and mouse.- *Food Chem. Toxicol.*, **23**, 809-819.
- [239] WEIDENBURNER, M. (2001).- ENCYCLOPEDIA OF FOOD MYCOTOXINS. -*Ochratoxicosis* 181, -*Ochratoxin A* 181-186, -*Ochratoxin B* 186, -*Ochratoxin C* 186, -*Ochratoxins* 187, -*Aspergillus* 26-31, -*Penicillium* 203-207, edit : Springer-Berlin (DEU), 296p.
- [240] WÜRGLER, F.E., FRIEDERICH, U. & SCHLATTER, J. (1991).- Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cnestin in *Salmonella typhimurium* TA102.- *Mutat. Res.*, **261**, 209-216.
- [241] YIANNIKOURIS, A. & JOUANY, J.-P. (2002).- Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal.- *INRA Prod. Anim.*, **15**, 3-16.
- [242] ZINGERLE, M., SILBERNAGL, S. & GEKLE, M. (1997).- Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo.- *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 220-224.

SITES INTERNET :

- [243] ALINORM 00/12A.- (Page consultée le 18/02/02) Comments on the proposed draft maximum level for ochratoxin A in cereals and cereal products (Agenda item 15c). Ochratoxin A DISCUSSION DURING 33rd CCFAC. – Adresse URL : http://www.who.int/fsf/Chemicalcontaminants_A_DISCUSSION_33CCFAC.htm
- [244] ATLAS OF PATHOLOGY.- (Page consultée le 26/02/02) Ochratoxicosis.- Adresse URL : <http://poultrymed.com>
- [245] BAUDRIMONT, I., SOSTARIC, B., YENOT, C. BETBEDER, A.-M., DANO-DJEDJE, S., SUNNI, A., STEYN, P.S. & CREPPY, E.E. (2001).- (Page consultée le 26/02/02) Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. Springer-Verlag.- Adresse URL : <http://link.springer.de/link/service/journals/00424/contents194>
- [246] BENESIC, A., MILDENBERGER, S. & GEKLE, M. (2000).- (Page consultée le 26/02/02) Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. Springer-Verlag.- Adresse URL : <http://link.springer.de/link/service/journals/0024/contents199>
- [247] CCFAC (Codex Committee on Food Additives and Contaminants).- (1998).- (Page consultée le 14/09/02) 31st Session.- Adresse URL : <http://www.codex@fao.org>
- [248] CREPPY, E.E. (2002).- (Page consultée le 04/04/02) Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe.- *ScienceDirect. Toxicology Letters*.- Adresse URL : <http://www.scienceonline.com/>

- [249] DGCCRF (1999).- (Page consultée le 14/09/02) Ochratoxine A dans les cafés, les produits céréaliers et les céréales.- Adresse URL : <http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/activites/labos/1999/cafe.htm>
- [250] DGCCRF (2000).- (Page consultée le 14/09/02) Recherche d'ochratoxine A dans le jus de raisin et la bière.- Adresse URL : http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/consommation/contrôles_alimentaires/actions/ochratoxine0501.htm
- [251] DIGITAL LEARNING CENTER FOR MICROBIAL ECOLOGY.- (Page consultée le 03/03/02) Microbe 2001.- Comm Tech Lab, Michigan State University c 1999.- Current maintenance supported by International Society for Microbial Ecology and the Comm Tech Lab.-
Adresse URL : <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlcome/200/microbemonth.htm>
- [252] EDLEFSEN, M. & BREWER, S. (1996).- (Page consultée le 15/04/02) Ochratoxin *In* The National Food Safety Database.- Adresse URL : <http://foodsafety.ifas.ufl.edu/il/il098.htm>.
- [253] FRANK, M. (Page consultée le 15/04/02) Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNUE sur les Mycotoxines (1999).- « Prévention des mycotoxines et décontamination ».- Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/colloques/ogm1/04.pdf>
- [254] GUILLOU, M.(1998).- (Page consultée le 14/09/02) Lettre d'information sur les réglementations et les contrôles relatifs à la qualité et à la sécurité de la chaîne alimentaire.- Notre alimentation N°14.- Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/basedoc/aaat2000sa0249.pdf>
- [255] KAST, W.K. (2002).- (Page consultée le 03/03/02) Bodytisbekämpfung : kulturtechnisch- chemisch-okologisch.- Infodienst Baden - Württemberg.- Adresse URL: <http://www.landwirtschaft.mlr.baden.wuerttemberg.de/start.htm>
- [256] LOPEZ-GARCIA, R. & PARK, D. Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNUE sur les Mycotoxines (1999).- (Page consultée le 15/04/02) « Systèmes de gestion intégrée des mycotoxines ».- Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/colloques/ogm1/04.pdf>
- [257] OBRECHT-PFLUMIO, S. & DIRHEIMER, G. (2001).- (Page consultée le 26/02/02) Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A.- Springer-Verlag.- Adresse URL: <http://link.springer.de/link/sevice/journals/0024/content.../s00204-001-0284-3ch100.htm>
- [258] PICTORIAL SUPPLEMENT TO THE FIFTH KINGDOME.- (Page consultée le 03/03/02) Chapter 21.- c. Mycologue Publications 2001.- Adresse URL: <http://www.mycolog.com/chapter22.htm>
- [259] RILEY, R.T. & NORRED, W.P. Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNUE sur les Mycotoxines 1999).- (Page consultée le 15/04/02) Prévention des mycotoxines et décontamination : Mä s, étude de cas. - Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/colloques/ogm1/04.pdf>
- [260] WALKER, M. R. (1999).- (Page consultée le 15/04/02) « Mycotoxines présentant un intérêt croissant : ochratoxines ».- In : Troisième Conférence Internationale Mixte FAO/OMS/PNUE sur les Mycotoxines (1999).- Adresse URL : <http://www.afssa.fr/ftp/colloques/ogm1/04.pdf>

Toulouse, 2002

NOM : ROUVIER

PRENOM : Marion

TITRE : L'OCHRATOXINE A : NATURE, ORIGINE ET TOXICITE :

RESUME :

L'OTA est une mycotoxine de répartition mondiale, synthétisée par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Ce composé est néphrotoxique chez l'animal et chez l'homme et cancérigène dans différentes espèces. Cette étude vise à présenter la nature et l'importance du risque chez l'homme et surtout l'animal. Les conditions de contamination des aliments sont tout d'abord décrites dans le but de préciser l'exposition des animaux à l'OTA. Puis les différentes formes d'ochratoxicose chez l'animal sont détaillées afin de souligner la gravité de l'intoxication dans les conditions d'élevage. Le devenir de la mycotoxine dans l'organisme et les bases moléculaires de sa toxicité sont alors envisagés . Ceci permet de comprendre les mécanismes impliqués dans la néphrotoxicité et la carcinogénicité ainsi que le danger de la persistance à l'état résiduel de l'OTA. Ce travail se termine par une évaluation du risque pour l'animal et pour l'homme, en France, et en soulignant le rôle joué par le vétérinaire.

MOTS CLEFS :

OCHRATOXINE A OTA MYCOTOXINE ASPERGILLUS PENICILLIUM MYCOTOXICOSE NEPHROPATHIE PORC NEPHROPATHIE ENDEMIQUE DES BALKANS NEB ALIMENT CEREALES

ENGLISH TITLE : OCHRATOXIN A : NATURE, ORIGIN AND TOXICITY

ABSTRACT :

OTA is a mycotoxin of mundial distribution produced by fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* genus . This compound is nephrotoxic for animals and men and carcinogenic in different species. This study aims at underlining the nature and the importance of the risk in men and above all in animals. The modalities of contamination of foodstuffs are first described in order to precise the animals exposition. Then the different forms of ochratoxicosis are presented for insisting on the importance of the intoxication in breeding conditions. What this mycotoxin becomes in the organism and the molecular basis of its toxicity is envisaged. We understand the mecanisms involved in nephrotoxicity and carcinogenicity and the danger of OTA persistence at a residual stade. At last, this work ends with an estimation of the risk for animals and for men in France and stressing the role played by the veterinary.

KEY WORDS :

MYCOTOXIN ASPERGILLUS PENICILLIUM MYCOTOXICOSIS NEPHROPATHY PIG BALKANS
ENDEMIC NEPHROPATHY FOOD CEREALS