

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

I.1 Champignons ochratoxinogènes

L'ochratoxine A (OTA) est élaborée par des moisissures appartenant principalement au genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont des champignons de stockage qui tendent à contaminer les denrées alimentaires pendant leur stockage sauf dans le cas de raisins qui se contaminés pendant la récolte (Zimmerli et Dick, 1996).

Parmi les différentes espèces appartenant au genre *Aspergillus* on distingue : *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus ochraceus*, au genre *Penicillium* : *P. viridicatum*.

A. carbonarius et *A. ochraceus* faisant partie des Deuteromycètes (champignons imparfaits, reproduction asexuelle) ordre des Hyphomycètes, famille des Moniliales.

A. carbonarius possède un thalle à mycelium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules. Les conidies sont des couleurs noire et présentent une forme verruqueuse de diamètre 7-9 µm. *A. carbonarius* présente de sclérotés de couleur jaune grisâtre.

La colonie d'*A. ochraceus*, sur un milieu MA (Malt Agar), est granuleuse, ocre à chamois claire. Sur le milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar), le diamètre de la colonie est de 40 à 52 mm après 07 jours d'incubation à 25 °C. Le stipe est de 400 à 1000 µm de couleur hyaline jusqu'à légèrement brune. Les vésicules sont globuleuses de diamètre de 20-35 µm. Les conidies sont hyalines et rondes, de diamètre de 2,5 à 3,5µm (Cahagnier et al., 1998). Le conidiophore est rond, rugueux et pigmenté. *A. ochraceus* peut produire des sclérotés qui sont incolores au début, puis violacés à pourpres quand la culture est vieille (Annexe 1).

A. carbonarius est un contaminant majeur de certains denrées tropicales et subtropicales tel que les raisins et ses dérivés (Zimmerli et Dick, 1996). Dans cette filière le risque de contamination en OTA commence sur le terrain. Récemment, il a été montré que *A. carbonarius* pourrait être responsable de la production d'OTA dans les raisins (Pitt, 2000 ; Verga et Kozakiewicz, 2006). Dans le cas du café, il a été montré que *A. carbonarius* et *A. ochraceus* sont responsable de la production de l'OTA dans le café (Belli et al., 2005).

Aspergillus ochraceus est largement réponsus dans l'environnement. Il a été isolée à partir des végétaux en décomposition, de sol, de déserts. Il contamine plusieurs produits agricoles comme les céréales, le café, les épices, les cacahuètes et le maïs (Kozakiewicz, 1989 ; Wilson et al., 2002). *Aspergillus ochraceus* est considéré comme le principale espèce producteur de l'ochratoxine A dans les climats chauds (Krogh, 1987).

Penicillium viridicatum synonyme de *P. verrucosum* fait partie de Deuteromycètes, sous groupe des *Penicillium*, l'appareil sporifère est terverticillé, à paroi rugueuse. Les phialides

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

sont ampouliiformes à col court, les conidies sphériques à ellipsoïdales avec une paroi lisse ou légèrement rugueuse, portées en chaîne irrégulière.

Les colonies sur le milieu CYA de 28 à 32 mm de diamètre, mycélium de texture veloutée à granuleuse, ou moins souvent floconneuse.

Présence de sillons radiaux peu profonds et d'un amas central, sillons nombreux à la périphérie. Marge blanche étroite et fine. Conidiogénèse modérée à forte, jaune-vert, production d'exsudat jaune pâle, marron pâle ou rose pâle, des pigments solubles sont parfois produits (orange ou marron-rouge) (selon la classification de Pitt, 1987). C'est une espèce ubiquiste souvent associé aux céréales. (Annexe 2)

I.2 Origine et structure

L'ochratoxine A a été isolée pour la première fois en 1965, par un groupe de chercheurs Sud-africains à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965 a et b). Cette toxine est un métabolite secondaire appartient à la famille des polycétacides (Turner, 1971). Plus précisément au groupe des ochratoxines élaborées par des diverses moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, notamment par *A. ochraceus* et *P. viridicatum*. Il s'agit de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine lié par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyl en C₇, au groupement amine de la L-β-Phénylalanine.

L'ochratoxine B (OT B) est le dérivé non chloré de l'OTA. L'ochratoxine C (OTC) est son ester éthylique, l'ochratoxine α est le dérivé isocoumarine obtenue à la suite de l'hydrolyse de la liaison peptidique avec élimination de phénylalanine.

Structurellement l'OTA, l'OTB et l'OTC diffèrent très légèrement les uns des autres, cependant ces différences ont les effets marqués sur leur potentiel toxique respectif. L'OTA est à la fois la plus répandue et la plus toxique (Steyn, 1984). La structure de l'OTA est représentée dans la figure 1

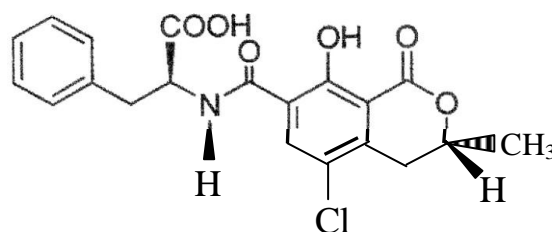


Figure 1 : Structure de l'ochratoxine

(d'après Van der Merwe et al, (1965 a et b) ; Pohland et al, (1982) et IARC (1993)

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

I.3 Propriétés physico-chimiques

L'OTA est un solide blanc de masse molaire 403,8 g/mol, ayant un point de fusion de 90 °C lorsque elle est cristallisée dans le benzène et de 169 °C lorsque elle est cristallisée dans le xylène (Pohland et *al.*, 1982). Son spectre d'absorption ultra violet (UV) varie avec le pH et la polarité de solvant. L'OTA possède un maximum spectre d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500/mol x cm dans le méthanol (Pohland et *al.*, 1982). Dans les mêmes conditions, ce coefficient est de 6400 pour la 4R-hydroxy-OTA (4R-OH-OTA), alors que l'OT α absorbe à 338 nm avec un coefficient de 5600 et l'OTB absorbe à 318 nm avec coefficient de 6500. Dans le bicarbonate de sodium 0,1M (pH = 7, 4), pour l'OTA ce maximum spectre est à 378 nm avec un coefficient d'extinction de 14700 (Pohland et al, 1984) .

L'OTA présente un maximum spectre d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol 96 % et 428 nm dans l'éthanol absolue (Pohland et *al.*, 1984).

L'OTA est partiellement dégradée dans des conditions normales de cuisson (Müllers, 1982) et peut aussi être transformée en 3-S-OTA (Bruinink et *al.*, 1997). Elle est complètement dégradée par un excès d'hypochlorite de sodium (Castegnaro et *al.*, 1991).

I.4 Facteurs affectant la production de l'OTA

I.4.1 Température et humidité

La production de l'OTA est liée aux conditions de température, d'humidité ambiante et de teneur en eau de support contaminé (A_w) (Pitt, 1987). Les valeurs minimales d' A_w pour la production de l'OTA oscillent entre 0,83 et 0,90 en fonction de la moisissure étudiée (Northolt et *al.*, 1979). La température optimale de la production de l'OTA par *A. ochraceus* est de 28 °C, cette production est fortement réduite à 15 °C ou 37 °C (Trenk et *al.*, 1991). Au contraire *P. viridicatum* croît dans une gamme de température plus large qui varie de 04 à 30 °C en présence d'une humidité de 22 %. (Mislivec et Tuite, 1970).

Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par les Penicillia, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les Aspergilli qui la fabriquent (Pohland et *al.*, 1992 ; Miller, 1995, Verga et al ; 1996). C'est pour cette raison que la présence d'OTA a été démontrée dans de nombreux produits agricoles de différentes régions du monde (Smith et *al.*, 1994).

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

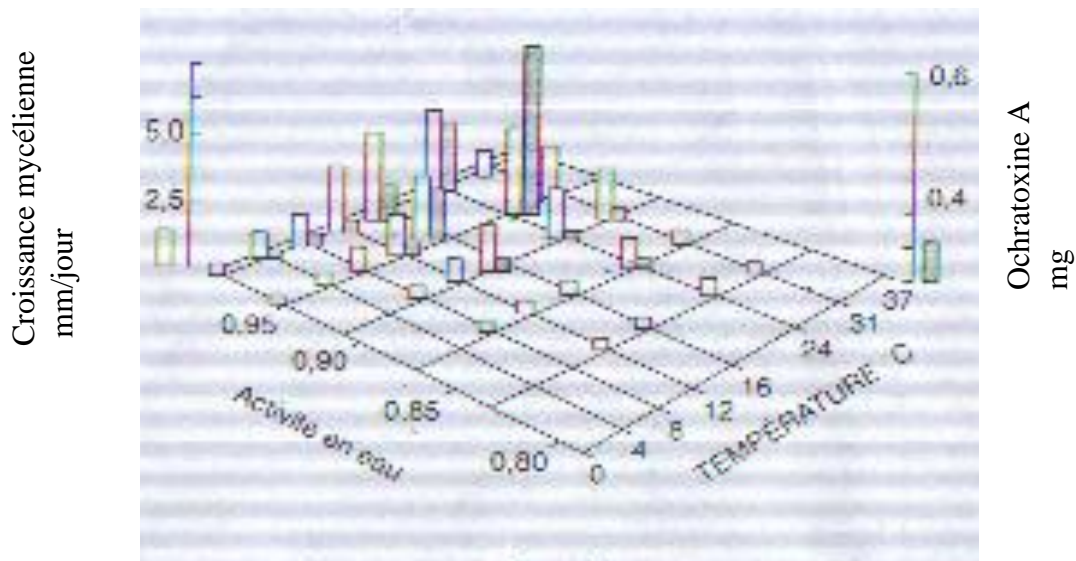


Figure 2 : Effet de l'activité d'eau et la température sur la croissance de *Penicillium viridicatum* et production de l'OTA. (d'après Steyn, 1984).

Selon la figure, l'optimum d' A_w de croissance de *P. viridicatum* soit identique à celle de production de l'ochratoxine A, (0,95), la température joue un rôle important. La croissance de ce champignon peut avoir lieu entre 0 et 31°C à A_w 0,95, alors que la synthèse d'ochratoxine A ne pourra avoir lieu qu'entre 12 et 24 °C. (Steyn, 1984).

I.4.2 Acidité de milieu

L'OTA se forme préférentiellement sur les aliments acides (Cuero et *al.*, 1987).

I.4.3 Lumière

AZIZ N.H et al (1997) montrent que la production de l'OTA est beaucoup plus importante à la lumière qu'à l'obscurité. A 25 °C et après 11 jours d'incubation, la concentration de l'OTA est environ 04 fois supérieur à la lumière qu'à l'obscurité (AZIZ et *al.* 1997).

I.4.4 Substrat

Les arachides et le soja sont plus fréquemment contaminés par l'ochratoxine A formée par *A. alutaceus* que le colza, le blé ou maïs, alors que le meilleur substrat pour la production d'OTA par *P. verrucosum* est le maïs (Madhyastha et *al.*,1990). Cette spécificité de substrat

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

provient de différences physiques (activité d'eau, conductivité thermique, oxygénation) et chimiques (composition en lipides, protéines, acides aminés, acides gras, minéraux) (Le Bars, 1982 ; Lacey, 1989). La proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'OTA par *A. alutaceus* et *P. verrucosum*. Il y a une proportionnalité entre le taux de protéines contenu dans l'orge et l'apparition d'OTA (Hägg, blom et Gosh, 1985). En Europe et en Canada, *P. verrucosum* est considéré comme la principale moisissure productrice d'OTA dans les céréales (JECFA, 2002).

Suivant le substrat, les conditions optimales de croissance vis-à-vis de l'humidité et de la température sont différentes. Il faut toujours des taux bien supérieurs en eau pour le développement de la toxine sur l'orge (tableau 1).

Tableau 1 : Condition minimales et optimales de production d'ochratoxine A par *Penicillium viridicatum* sur le blé et sur l'orge (d'après Schuh et Schweighardt, 1981).

Produits	Blé	Orge
Conditions		
Température en °C	24	24
Optimum humidité en %	21,8	27,1
Température en °C	24	24
Minimum humidité en %	18,5	21,6
Minimum température en °C	4	4
Humidité en %	28,6	40,5

I.5 Voie de biosynthèse de l'ochratoxine A

La production de l'OTA est sous contrôle de cluster regroupant tous les gènes de la voie de biosynthèse de polycetoacides. Cependant, connaissant l'organisation de ces gènes et la voie de biosynthèse de l'OTA ne sont pas encore complètement établie. Cependant, des expériences en utilisant les précurseurs marqués ^{14}C et ^{13}C ont montré que la partie de phénylalanine provient de la voie de Shikimates et la partie de dihydroisocoumarine de la voie des pentaketides.

En 1979, Huff et Hamilton proposent une voie hypothétique de biosynthèse dans la quelle la melleine et l'hydroxymelleine (herbicides) seraient probablement des précurseurs de l'OTA. Cependant, des résultats plus récentes (Harris et Mantel ; 2001) rendent cette

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

hypothèse ambiguë et selon eux la melleine ne jouerait pas un rôle dans la voie de biosynthèse de l'OTA.

L'étape centrale de la voie de biosynthèse de la partie isocoumarine de l'OTA consiste à la condensation décarboxylative d'une unité acétate et de 04 unités malonate grâce à une polycetone synthase (PKS). Le squelette subit ensuite des réaction de cyclisation, aromatisation, méthylation, oxydation et chlorination (Steyn et Holzapfel, 1970). Une fois formé, la chaîne de polykétides est modifiée par la formation d'un noyau lactone (Synthèse de la melleine) et par l'addition d'un groupe carboxylique (Synthèse d'ochratoxine β). Plus tard l'atome de chlore est incorporée par l'action d'une chloroperoxydase (Synthèse d'OT α). Finalement, l'ochratoxine A synthase catalyse l'enchaînement d'OT α à la phénylalanine. (Figure 3).

Récemment, il a été démontré que le gène de PKS est différent entre *A. ochraceus* (O'callaghan et al., 2003) et *P. nordicum* (Geisen et al., 2004). En plus, chez *Penicillium*, Geisen et al, (2004) ont observé que *P. verrucosum* ne possède pas la même PKS que *P. nordicum* pour la biosynthèse d'OTA.

Chaque champignon peut avoir quelque dizaines de polycetones synthases qui sont des enzymes clé de la voie de biosynthèse des métabolites secondaires. Récemment, une partie du gène des polycetones synthases impliquées dans la voie de la biosynthèse de l'OTA chez *A. ochraceus* a été décrite par Ali atoui (2006) il s'agit des polycetones synthases AoKS1 et AoLC35-12, cependant leur rôle dans la voie de biosynthèse n'est pas encore défini.

Selon des études menées par Karolewicz et Geisen (2005) réalisées sur l'espèce *P. nordicum*, la polycetone synthase *otpk_s* PN code pour domaine d'une Kétoacyl synthétase et une acyltransferase, ce qui est typique pour les polycetones synthases fongiques.

D'après leur résultats, il existe probablement une corrélation entre l'expression du gène *otpk_s*PN et la production d'OTA chez *P. nordicum* dans les milieux propices à la formation d'OTA où un haute niveau d'expression de gène est observé.

Chez *A. ochraceus*, O'callaghan et al., (2003) montrent que l'enzyme responsable de la synthèse de l'OTA est une PKS de type nonacétole synthase, cette PKS est la même que AoLC35-12.

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA

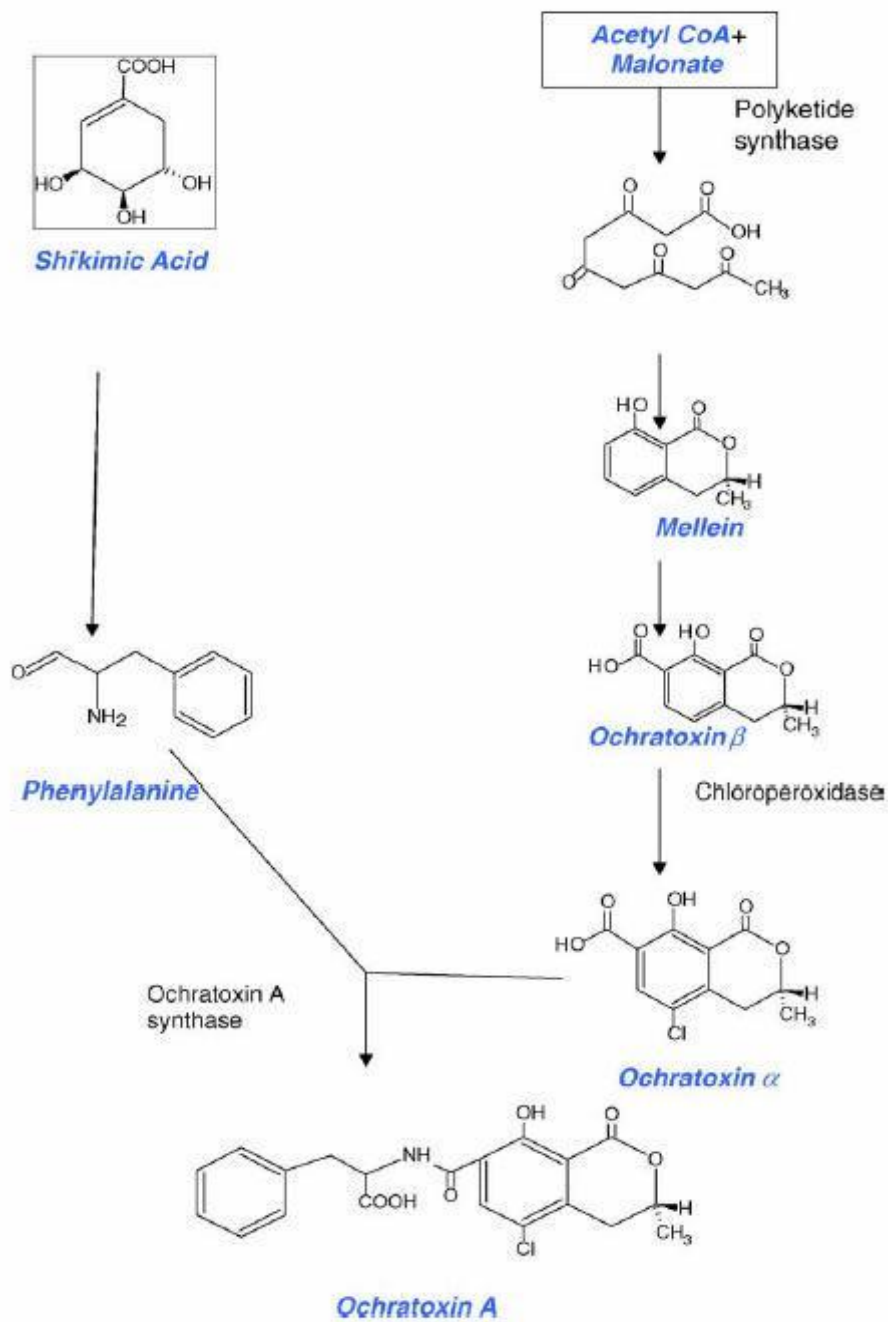


Figure 3 : La voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA (d'après Huff and Hamilton, 1979)

CHAPITRE I : Production et biosynthèse de l'OTA