



















## II.1 Exposition de l'homme à l'OTA

L'ochratoxine A entre dans la chaîne alimentaire de l'homme soit par consommation de produits contaminés, soit par voie indirecte lors de consommation de produits issues d'animaux nourris avec des grains contaminés (Dragacci et *al.*, 2005) (Figure 4).

On retrouve l'OTA essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine...) mais aussi dans les abats et les viandes d'animaux recevant des aliments contaminés (Jorgensen, 1998), ainsi que dans le riz, le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits sec (figues pruneaux) (Krogh, 1977a, 1987). On montre sa présence également dans les produits dérivés de céréales comme la farine, le pain, les pâtes, (Majerus et *al.*, 1993). On la retrouve aussi dans la bière ( El-Dessouki, 1992, Scott et Kanhere, 1995) et même dans le raisin et ses produits (vin et Jus de raisin) (Zimmerli et Dick, 1996 ; Hôhler et *al.*, 1977). De même, on a pu la mettre en évidence dans le sang et les tissus des animaux d'élevage où elle s'accumule au niveau rénale et hépatique (Hult et *al.*, 1980, 1984 ; Terplan et Wenzel, 1993 ; Mac donal et *al.*, 1993 ; Garie,1996).

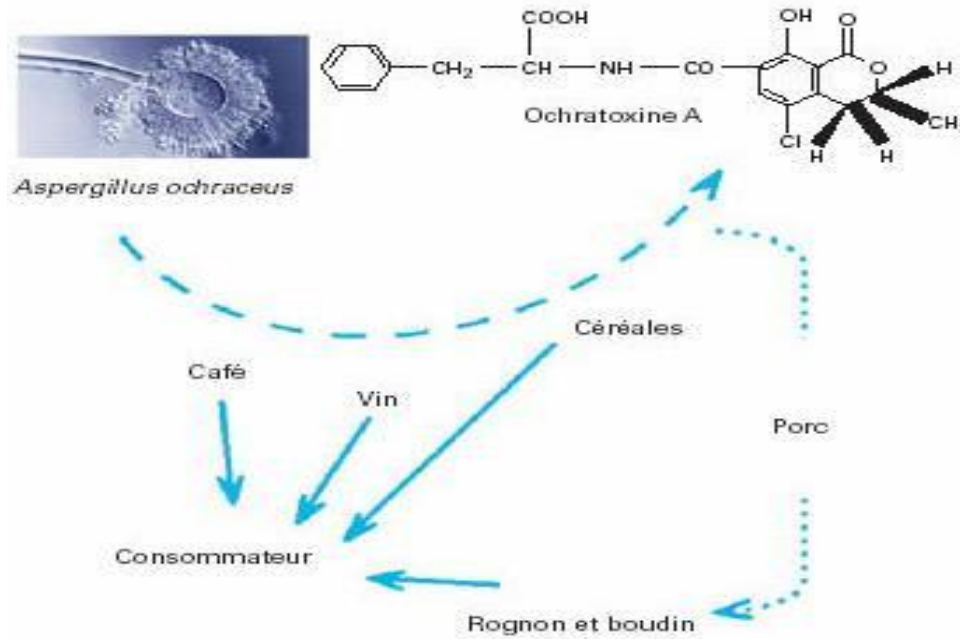
Les concentrations en OTA retrouvés dans les aliments varient de quelque ng/Kg jusqu'à plusieurs dizaines de mg/Kg (Krogh,1987 ; Kuiper-Goodman et Scott, 1989).

Une récente compilation mondiale (Dragacci et *al.*, 2005) portant sur ces vingt dernières années montre que les plus forts taux et fréquences de contamination par l'OTA sont observés en Europe.

L'OTA a été détectée dans des échantillons de sang humains de divers pays du monde : la Suède, la Norvège (Thuvander et *al.*, 2001), le Canada, l'Allemagne, l'Ex-Yougoslavie (Kuiper-Goodman et Scott, 1989), le Japon (Ueno et *al.*, 1998), l'Italie (Breitholtz-Emanueleson et *al.*, 1994), la France (Greppy et *al.*, 1991,1993) ce qui confirme la large exposition à l'OTA.

On retrouve aussi l'OTA dans le lait de vache et maternel (Breitholtz-Emanueleson et *al.*, 1994).

Le passage de l'OTA dans le lait de vache est possible mais en quantité infime, en effet les ruminants seraient capables de dégrader l'OTA grâce à leur flore ruminale (Protozoaires).



**Figure 4 :** La contamination de la chaîne alimentaire par l'OTA (Dragacci *et al.*, 2005)

## II.2 Toxicocinétique de l'OTA

L'OTA pénètre dans les cellules principalement par un transport actif. Elle est absorbée essentiellement au niveau de l'intestin plus précisément à partir du Jéjunum proximal (Kumagai, 1988 ; Kanisawa et Suzuki, 1990). Cependant, une faible quantité est absorbée au niveau de l'estomac par diffusion passive de la forme non ionisée (Lillehoj *et al.*, 1979 ; Galtier *et al.*, 1981). Elle est ensuite distribuée aux différents organes via le système porte et le foie (Kumagai et Aibara, 1982). Elle suit le cycle enterohépatique (Fushs *et al.*, 1988).

Des études récentes montrent que l'absorption s'effectue aussi via des transporteurs comme MRP<sub>2</sub> (Transporteur d'anions organiques multispécifique nommée protéine MRP<sub>2</sub> associée aux résistances multiples aux médicaments) (Berger *et al.*, 2003 ; Sergent *et al.*, 2005).

Cependant, on retrouve peu d'OTA sous forme libre dans le sang. En effet, l'OTA a une très grande affinité pour certaines protéines plasmiques où elle est fixée à 90% (Hagelberg *et al.*, 1989). Elle se fixe sur l'albumine sérique et sur une macromolécule d'un poids moléculaire de 20 KDa (Galtier *et al.*, 1979 ; Stojkovic *et al.*, 1984 ; Il'ichev *et al.*, 2002 a). Cette fixation est un phénomène saturable. Elle se fixe à l'albumine sérique ( $K_{\text{affinité}} = 5.8.10^4$

M<sup>-1</sup> chez l'homme) avec une saturation pour des taux de quelque centaines de µg/ml (Galtier et al. 1979 b). Le mécanisme par le quel l'OTA se lie aux protéine est mal connu.

Chez le rat, un traitement par la Phénylbutazone, déplace l'OTA de sa fixation à l'albumine vers la forme libre, ce qui abaisse la Dose Létale<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub>) et augmente la toxicité. La fixation de l'OTA sur les protéines retarde le transport de l'OTA vers les différents organes et augmente sa demi-vie sérique et par conséquent contribuerait au développement des effets toxiques chroniques de l'OTA (Kumagai et Aibara, 1982).

C'est chez les humains que l'OTA possède la plus longue demi-vie dans le plasma qui est estimée a un mois (Studer-Rohr et al, 2000).

La distribution tissulaire de l'OTA chez le porc, le poulet ou la chèvre, suit en générale l'ordre suivant : reins > foies et muscles > graisses (Madsen et al., 1982 ; Mortensen et al., 1983 ; Harwig et al. ; 1983).

L'OTA est éliminé par toutes les voies d'excrétion (urinaire, fécale et biliaires) essentiellement par voie urinaire (30-40%) (Storen et al., 1982) une partie d'OTA qui se retrouve dans la bile peut être réabsorbée au niveau de l'intestin (Fuchs et al, 1988).

La pharmacocinétique d'élimination de l'OTA et ses métabolites a été étudiée, chez le rat, par l'équipe de Li et al, (1997). Ainsi les demi-vies d'élimination respectives de l'OTA, de l'OP-OA (correspond à la lactone ouverte), l'OT $\alpha$ , de la 4-OH-OTA, de l'OTB, et de l'OTC sont les suivantes en heurs : 103  $\pm$  16 ; 50  $\pm$  2,8 ; 9,6  $\pm$  2,3 ; 6  $\pm$  0,9 ; 4,2  $\pm$  1,2 ; 0,6  $\pm$  0,2. L'OTA et l'OTB et l'OT $\alpha$  sont essentiellement éliminés par les urines (> 48 %) et la 4-OH-OTA par la bile (41 %). En conclusion, l'OTA est éliminée très lentement alors que ses métabolites le sont nettement plus rapidement.

## II.3 Mécanismes moléculaires d'actions toxiques

### II.3.1 Effet au niveau de la transcription et de la traduction

*In vitro*, l'OTA inhibe spécifiquement la synthèse des protéines au niveau post-transcriptionnel en entrant en compétition avec la phénylalanine (Phe), lors de la réaction d' amino-acylation de l'ARN de transfert phénylalanine- tARN par la phénylalanine-tARN synthétase (Creppy et al, 1983). Il en résulte un arrêt de la réaction d' amino-acylation et de l'élongation peptidique. La synthèse d'ARN messenger peut être également inhibée (Meisner et al., 1983). Ces effets n'ont pas été confirmés pour l'instant *in vivo*.

### **II.3.2 Effet sur le métabolisme des glucides**

L'OTA génère une baisse de 25 % de la néoglucogénèse rénale (qui constitue une des voies majeures de métabolisme des glucides) chez des rats traités à 2 mg d'OTA/Kg de nourriture pendant deux jours (Meisner et Cimbala, 1986). Cet effet provient de l'inhibition par l'OTA de la synthèse d'ARN messager codant pour la phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK). Une telle baisse d'activité de cette enzyme a été aussi constatée par Meisner et Selanik, 1979 ; Meisner et *al.*, 1983 ; Meisner et Cimbala, 1986.

L'OTA peut avoir un effet hyperglycémiant, lié d'une part à la stimulation de la glycogénolyse et d'autre part à la formation de glucose à partir d'autres nutriments et notamment d'acides aminés glucoformateurs (Verma et Shalini, 1998).

### **II.3.3 Effet sur la respiration mitochondriale**

La respiration mitochondriale est diminuée *in vitro* à la suite d'une exposition à l'OTA. Ceci est dû à une altération des transporteurs de phosphate de la membrane mitochondriale et à une inhibition de l'activité ATPasique de la membrane interne de la mitochondrie (Meisner et Chan, 1974).

L'OTA inhibe compétitivement les activités des succinate déshydrogénase et cytochrome C oxydase mitochondriales de rat (Wei et *al.*, 1985). Elle inhibe également l'activité de certaines enzymes indispensables au cycle de Krebs induisant une diminution de la production d'ATP.

### **II.3.4 Effet sur le métabolisme des lipides**

Il a été montré que l'OTA augmentait la peroxydation lipidique (PL) *in vivo* et *in vitro* (Rahimtula et *al.*, 1988). Ceci pourrait expliquer l'effet nécrosant de l'OTA au niveau du rein puisque la peroxydation des acides gras polyinsaturés inclus dans les membranes phospholipidiques a été proposée comme mécanisme d'action de nombreux xénobiotiques à l'origine d'altérations tissulaires structurales (Halliwell et Gutteridge, 1988). Meki et Hussein (2001), ont montré que l'utilisation de mélatonine (Connue pour son pouvoir antioxydant), réduisait le stress oxydatif généré par l'OTA au niveau rénal et hépatique dans les rats mâles *Sprague-Dawley*.

Cette PL mène de plus à une modification de l'homeostasie calcique hépatique et rénale, avec une augmentation de taux de calcium cytosolique (Chong et Rahimtula., 1992).

## II.3.5 Effets au niveau de l'ADN

### II.3.5 1 Mutagénicité de l'OTA

L'OTA n'induit pas d'inhibition de la croissance chez différentes souches de *Bacillus subtilis* testés (Ueno et Kubota, 1976) et aucune recombinaison mitotique n'est observée chez *Saccharomyces cerevisiae* D<sub>3</sub> après un traitement des cultures par l'OTA (Kuczuk et al., 1978). Néanmoins, une activité mutagène par test d'Ames a été mise en évidence par l'équipe Hennig (Hennig et al., 1991) en faisant métaboliser l'OTA préalablement par des hépatocytes de rat. Ces auteurs ont également constaté une induction d'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes humaines cultivés dans un milieu contenant de l'OTA métabolisée par ces même hépatocytes.

Dans les cellules FM<sub>3</sub>A de carcinome mammaire de souris, l'OTA nécessite une activation métabolique pour induire des mutations génétiques (Umeda et al., 1977). Dans des cellules de lymphome de souris, de telles mutations ne sont pas observés avec ou sans activation métabolique préalable (Bendele et al., 1985 a). Par contre la génotoxicité de l'OTA a été démontrée en utilisant d'autres types de cellule de mammifères. Une désorganisation de la synthèse d'ADN a été observée dans des hépatocytes de rat ACI et de souris C<sub>3</sub>H en culture (Mori et al., 1984).

D'autre part, l'OTA provoque une légère augmentation de la réponse au SOS chromotest, sans relation dose-effet, ainsi qu'au SOS spot test (Auffray et Boutibonnes, 1986). Plus récemment, l'étude de l'induction de l'activité de réparation SOS de l'ADN chez *Escherichia coli* PQ37 a montré que 4 mM d'OTA induise une réponse SOS en l'absence d'activateurs exogène (Malaveille et al., 1991 ; Malaveille et al., 1994). Ces résultats confirment ceux obtenus par Vogel et Nivard (1993), qui montrent une combinaison au niveau des chromosomes lors de la mitose chez la drosophile.

Une augmentation faible, mais significative et dépendante de la dose, des échanges entre chromatides sœurs a été aussi démontrée après traitement de cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) par l'OTA (Boorman, 1989).

Manolova et al., (1990) ont montré la présence d'aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains en présence de 15 nM d'OTA.

Des cassures simples brins ont été observées au niveau de l'ADN de rein, de foie de souris Balb/c et de rats (Creppy et al., 1985, Kane et al., 1986). Lebrun et Föllmann (2002) ont montré que l'OTA induisait, dose dépendante, des cassures simple brin de l'ADN

de cellules de rein de chien (MDCK). Très récemment cet effet a été confirmé par Simarro Doorten et *al.*, (2005) par des études de « Comet-assay ». cet effet est accru lorsque la toxine est incubée en présence de microsome de foie de rat.

### **II.3.5.2 Formation d'adduits à l'ADN**

L'OTA provoque la formation d'adduits à l'ADN dans différents organes de souris et de rats (Pfohl-Leszkowicz et *al.*, 1991, 1993 b). Cette formation est dépendant de la dose. Les adduits varient d'une organe à l'autre et d'une espèce à l'autre en fonction des voies de métabolisation (Pfohl-Leszkowicz et *al.*, 1993 a et b). Le traitement de souris gestantes par l'OTA a aussi induit la formation d'adduits à l'ADN à la fois chez la mère et chez sa progéniture (Petkova-Bocharova et *al.*, 1998).

Des adduits sont formés principalement sur la guanine mais aussi sur l'adénine (Azémar, 2000).

Il y a une corrélation entre les adduits à l'ADN au niveau des reins et les tumeurs rénales (Castegnaro et *al.*, 1998).

Des adduits à l'ADN ont été détectés, par la méthode de post-marquage au P<sup>32</sup>, dans des plusieurs animaux traité par l'OTA (Manderville et Pfohl-Leszkowicz, 2005). Mais la nature de « L'entité » liée à l'ADN est controversée. Deux hypothèses générales ont été proposés pour expliquer le mécanisme de cancérogenèse de l'OTA :

1/ L'OTA, peu métabolisée, n'est ni mutagène, ni génotoxique, et les effets induits seraient une conséquence secondaire d'un stress oxydatif (Turesky, 2005 ; O'Brien et Deitrich, 2005).

2/ L'OTA est mutagène et génotoxique après métabolisation impliquant majoritairement des peroxydases ( Manderville, 2005 ; Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 2005a ; Manderville et Pfohl-Leszkowicz., 2005).

## **II.4 Effets toxiques**

### **II.4.1 Toxicité aiguë et subaiguë**

La toxicité de l'OTA varie en fonction de l'espèce, du sexe et de la voie d'administration. La Dose Létale (DL<sub>50</sub>) varie de 0,2 mg/Kg de poids Corporel chez le chien à 68 mg/kg chez la souris par voie orale (Tableau 2 ). Les femelles sont plus sensibles. L'OTA est plus toxique par voie intraperitoniale que par voie orale.

L'OTA a de nombreux effets délétères sur différents types d'organes d'animaux domestiques. Le rein est l'organe cible de l'OTA (Pohland et *al.*, 1992 ; pfohl-Leszkowicz et castegnaro, 1999). Cependant, d'autres organes sont aussi atteints tel que le foie (Huff et *al.*, 1975) et le ractus gastro-intestinale chez le poulet (Elling et *al.*, 1975).

**Tableau 2 :** DL<sub>50</sub> de l'ochratoxine A chez différentes espèces animales (Faucet-Maquis, 2005).

<b>Animal</b>	<b>DL<sub>50</sub> (mg/Kg de poids)</b>	<b>Voie d'administration</b>
Souris Swiss (mâle)	51-68	orale
Souris femelle	22	intrapéritonéale
Rat (mâle-femelle)	28 et 21,4	orale
Rat (mâle-femelle)	12,6 et 14,13	intrapéritonéale
Rat (nouveau-né)	3,9	orale
Caille japonaise	16,5	orale
Cobaye (mâle-femelle)	9,1 et 8,1	orale
Poulet	3,3	orale
Dinde	5,9	orale
Truite arc-en-ciel	4,7	intrapéritonéale
Porc	1	orale
Chien	0,2	orale

## II.4.2 Toxicité chronique

### II.4.2.1 Néphrotoxicité

L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testés à l'exception de ruminants adultes (Ribelin et *al.*, 1978).

Des études effectuées ont montré que l'OTA peut jouer un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine (Krogh et *al.*, 1973). Expérimentalement, des porcs exposés chroniquement à 0,2 ppm d'OTA développent des néphropathies en quelque mois. Pour 1 à 1,4 ppm d'OTA une décoloration des reins et des nécroses sont apparues après deux semaines (Elling, 1983 ; Elling et *al.*, 1985). Kane et *al.* (1986 b) ont constaté chez des rats, traitées par l'OTA, une augmentation significative dans l'urine de trois enzymes spécifiques d'une nécrose de la bordure en brosse des tubules proximaux (phosphatase alcaline, leucine aminopeptidase et  $\gamma$ -glutamyltransferase).

Dés 1972, Krogh a montré des similitudes entre la néphropathie porcine et la Néphropathie Endémiques des Balkans (BEN) et propose l'OTA comme l'un des agents pouvant jouer un rôle dans l'étiologie de cette maladie. La BEN est une néphropathie

caractérisée par une tubulonéphrite interstitielle avec enzymurie. Son tableau clinique est bien stéréotypé (Radonic et Radosevic, 1992 ; Vukelic et *al*, 1992) : Céphalées fréquentes, douleurs lombaires, asthénie, anémie et amaigrissement, pigmentation pseudoaddisonienne (de type urochrome), absence d'hypertention, polyurie s'accompagnant d'une langue rouge et d'une sensation d'une soif et de goûter, insuffisance rénale chronique sans syndromes néphrétiques et sans œdèmes. L'évolution de la pathologie est lente et souvent asymptomatique. A long terme, elle conduit à une atrophie rénale sévère voire à des tumeurs de tractus urinaire chez l'homme (Chernozemsky et *al*, 1977 ; Marckovic, 1985). Des études épidémiologiques mettent en avant le lien entre la présence d'OTA dans la nourriture et l'incidence de la BEN (Petkova-Bocharova et *al*, 1988). Très récemment, il a été confirmé que les populations des régions balkaniques sont nettement plus exposées à l'OTA (Vrabcheva et *al.*, 2004 ; Petkova-Bocharova et *al.*, 2003a, Pfohl-Leszkowicz et *al.*, 2005 c).

L'inhibition par l'OTA des mécanismes de transport anionique des membranes basolaterales et de la bordure en brosse des cellules tubulaires, par compétition avec les anions organiques pour ces transporteurs est mise en cause cette néphrotoxicité (Kane et *al*, 1986b, Sokol et *al*, 1988). De plus la production d'ATP par les mitochondries, nécessaire à ces transporteurs est inhibée par l'OTA (Wei et *al*, 1985). Ainsi, l'OTA filtrée est réabsorbée dans les tubules proximaux mais s'y accumule, diminuant son élimination dans les urines et potentialisant ainsi ses effets toxiques (Schwerdt et *al*, 1996).

Kumarochi et *al.*, (1997) ont montré que l'OTA augmente le pH urinaire. Cela est due à une augmentation des ions bicarbonates par inhibition de la réabsorption.

### **II.4.2.2 Tératogénicité**

L'OTA est tératogène chez l'animal. Elle provoque des anomalies morphologiques divers chez le rat (Brown et *al.*, 1976), la souris (Hayes et *al.*, 1974), le hamster (Hood et *al.*, 1975 et 1976), le porc (Shreeve et *al.*, 1977) et les embryons de poulet (Gilani et *al.*, 1978). Celles-ci incluent : une mortalité fœtale augmentée, des malformations fœtales, une perte de poids de fœtus, une proportion anormale des fœtus présentant des hémorragies, une réduction de la taille des portées et des retards de croissance, anomalies des viscères et de squelette. Une nécrose de cellules cérébrales et une microcéphalie.

Des anomalies touchant les membres, le cou, les viscères et la taille ont été notés chez les embryons de poulet après l'injection d'OTA dans la poche d'air d'œufs fertilisés, à une dose de 5µg/œuf (Gilani et *al.*, 1978).



Il a été démontré que l'OTA administrée à la ratte se retrouve dans les embryons (Moré et Galtier, 1978). Elle passe le placenta et s'accumule dans les tissus fœtaux (Ballinger et *al.*, 1986). L'OTA altère un certain nombre de paramètres associés à la croissance et à la différenciation cellulaire embryonnaire chez le rat, en fonction de la dose (Mayura et *al.*, 1986) et chez la souris ; ce qui démontre l'action directe de cette toxine sur le développement embryonnaire. Récemment, il a été montré qu'une dose unique ingérée par la mère au 9<sup>e</sup> jour de la gestation, induit des adduits à l'ADN de reins et de foie des fœtus et de nouveau-nés plusieurs mois après leurs naissance (Petkova-Bocharova et *al.*, 1998). Certains, un an après, ont développé des cancers rénaux.

### **II.4.2.3 Immunotoxicité**

Lea et al, (1989) ont montré dans une étude *in vitro* que l'OTA inhibe la prolifération des lymphocytes périphériques T et B abolit la production d'interleukine 2 (IL<sub>2</sub>) ainsi que de ses récepteurs. L'OTA supprime l'activité de cellule tueuses ainsi que la production d'interféron (Luster et *al.*, 1987).

L'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et de la réponse immunitaire. Elle peut être à l'origine de lymphopénie, de régression du thymus et de suppression de la réponse immunitaire. Le système immunitaire du porc est sensible à des doses d'OTA inférieures à 1mg/Kg (une inhibition de 10 % de la réponse immunitaire est observée avec 0,06 mg/Kg d'OTA) dans les conditions normales d'élevage (Hult et *al.*, 1980, 1984) Des dose de 2,5 mg d'OTA/Kg de nourriture diminuent l'activité phagocytaire des macrophages et la production d'IL<sub>2</sub>chez le porc. Chez la souris Balb/c, l'OTA en dose unique intrapéritoneale de 5 µg/Kg, supprime la réponse immunitaire aux érythrocytes. Cet effet peut être prévenu par un traitement simultané avec la phénylalanine a une dose deux fois supérieur à celle de l'OTA (Haubeck et *al.*, 1987). Avec de fortes doses (20 à 80 mg/Kg en intrapéritoneale 1 sur 2 pendant 8 jours) chez les souris Suisse, on note un appauvrissement cellulaire important de la moelle osseuse avec une diminution de la masse thymique et une baisse de la capacité phagocytaire ainsi que l'inhibition de la croissance tumorale (Boorman et *al.*, 1984). On observe chez les cobayes ayant reçu de l'OTA à 5,6 mg/Kg de poids corporel, une nécrose et des oedèmes des ganglions lymphatiques, de la rate et de thymus ainsi qu'une leucopénie (Hagelberg et *al.*, 1989). De même, une immunosuppression est observée chez le poulet recevant de la nourriture contaminée par 0,5 à 2 mg/Kg pendant 21 jours.

Comparés aux témoins, les animaux ont moins de protéines sériques, moins de lymphocytes, un thymus et rate de poids réduit (Singh et *al.* ; 1990).

#### **II.4.2.4 Concérogénicité**

Dés 1971, Purchase et Van der Watt avaient émis l'hypothèse de la cancérogénicité de l'OTA. Chez des souris ayant reçues une nourriture contaminée par l'OTA, Kanisawa et Suzuki (1975) ont observé non seulement l'apparition de tumeurs rénales, mais également des tumeurs hépatiques.

Une étude effectuée par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), sur deux espèces de rats (*Lewis* et *Dark agouty*) a montré une susceptibilité plus importante des rats mâles par rapport aux femelles. La différence est beaucoup plus flagrante dans l'espèce *Dark Agouty* où les mâles développent des tumeurs alors que les femelles sont complètement épargnées (Castegnaro et *al.*, 1998 b). Ce qui confirme l'études de Bendele et *al.*, (1985 b). Des études concernant le patrimoine génétique des rats ont permis de mettre en évidence que la différence de susceptibilité était essentiellement liée au CYP2C qui est de nature différente chez le mâle et la femelle (Pfohl-Leskowicz et *al.*, 1998).

Lors de la dernière évaluation réalisée par le CIRC (IARC 1993), l'OTA a été classée dans le groupe 2B « Cancérogène possible pour l'homme ». En effet, les études épidémiologiques faites sur les patients bulgares n'ont pas été prises en compte car le groupe de travaille a estimé qu'il était difficile de séparer les patients atteints de BEN de ceux atteints de cancer de voies urinaire, bien qu'il soit démontré que la BEN est associée à une augmentation significative du nombre de tumeurs des voies urinaire supérieur et qu'elle peut être directement reliée à la consommation de nourriture contaminée par l'OTA dans cette région (Bordas et *al.*, 1973 ; Markovic, 1985 ; Chernozemsky et *al.*, 1977 ; Castegnaro et *al.*, 1987).

