

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

2

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

III.1 Voie oxydative

Il a été observé dans les microsomes de foie de rat, la peroxydation lipidique participe activement à la conversion de l'OTA en 4 S-OH-OTA (Omar et Rahimtula, 1993).

Le métabolisme de l'OTA pourrait être lié à un métabolisme de type oxydatif. Une diminution des adduits totaux dans l'ADN des reins et des testicules, a été observée suite à l'administration simultanée de superoxyde dismutase et de catalase avant le gavage des souris (Pfohl-Leszkowicz et *al.*, 1993 b). Ces adduits sont donc probablement produits par voie oxydative.

L'utilisation de vésicules séminales de bélier particulièrement riches en prostaglandine synthétase (PGHS), enzyme permettant la cooxydation de xénobiotiques (regroupe des produits naturels, médicaments et des polluants de l'environnement...) lors de la synthèse de prostaglandines (Eling et *al.*, 1990), a permis de montrer que l'OTA provoque la formation de micronoyaux (Degen et *al.*, 1994). Une modification de profil d'adduits chez la souris observée au niveau de rein et de foie avec disparition totale de certains adduits et atténuation des autres après un prétraitement avec l'asperine ou l'indometacine (inhibe partiellement la PGHS) avant l'administration de l'OTA (Obrecht-Pflumio et *al.*, 1996). En culture de cellules épithéliales pulmonaire humaines, l'utilisation de l'indometacine ou de NDGA (nordihydroguarétique acid), qui inhibe la lipoxygénase, a permis de montrer que l'OTA est métabolisée en métabolites génotoxiques par la lipoxygénase, alors que la PGHS a un effet protecteur (Pinelli et *al.*, 1999).

Le traitement de souris par 03 vitamines connues pour leur pouvoir antioxydant : La vitamine A ; E et C, a permis de diminuer la génotoxicité globale de l'OTA ; la vitamine C est la plus efficace des trois (Gross et *al.*, 1977 a). Les deux vitamines A et E, en plus de leur pouvoir antioxydant, modulent les enzymes de la cascade de l'acide arachidonique (AA) qui sont les PGHS appelés aussi cyclooxygénases (COX), et les lipoxygénases (LOX). Ces enzymes sont impliqués dans la génotoxicité de l'OTA (Pinelli et *al.*, 1999 ; El Adlouni et *al.*, 2000). La vitamine A induit la LOX et la COX2 (Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 2005 a).

III.2 Voie de conjugaison au glutathion

Généralement, la voie de métabolisation par conjugaison au glutathion est considérée comme une voie de détoxication (Jakoby et Habig, 1980). Mais certains dérivés provenant de la conjugaison au glutathion génèrent des composés électrophiles pouvant être mutagènes

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

et cancerogènes (Van Bladeren et *al.*, 1980). De plus, il est évident que l'accumulation de conjugués du glutathion peut être néphrotoxique (Monks et Lau, 1987). Deux classes de conjugués peuvent être distingués : Ceux agissant directement, sans activation métabolique (indépendantes de microsomes) et ceux devenant toxiques ou génotoxiques après métabolisation. Au niveau de rein, les dérivés conjugués au glutathion vont être métabolisés par action de la γ -glutamyltransferase et la glycénase en dérivé cystéine correspondant. Ces dérivés S.Cystéine sont transportés dans les cellules rénales où ils auront 03 possibilités :

a/ ils sont excrétés sous forme inchangée dans le plasma.

b/ ils sont N-acétylés en dérivés mercapturiques correspondants.

c/ ils sont soumis à l'action de β -lyase et forment des dérivés thiols très réactifs responsables notamment des effets néphrotoxiques ces dérivés thiols bloquent l'action de la glutathion peroxydase donc il y aura augmentation de H_2O_2 qui génère des formes OH^\cdot à l'origine de la lipoperoxydation pouvant conduire à la formation des produits radicalaire très réactifs.

L'administration de phorone et la N-acetylcystéine (NAC) à des souris, avant celle de l'OTA, provoque la diminution de taux de glutathion dans les reins et les testicules et entraîne une diminution de taux d'adduits. Par contre dans le foie, le NAC augmente le taux de glutathion, et on observe une augmentation considérable de taux d'adduits. Ces résultats indiquent que la glutathion joue un rôle primordial dans la génotoxicité de l'OTA, soit par formation de dérivés conjugués génotoxique, soit par ses propriétés oxydo-réductrices.

Deux autres substances, qui diminuent la fixation de glutathion aux xénobiotiques ; le diéthylmaléate (DEM) et la buthionine sulfoximine (BSO) qui agissent par deux mécanismes différents. Le premier agit par compétition au niveau de la glutathion transférase alors que le deuxième agit par inhibition de la γ -glutamine synthétase.

La figure 5 présente les voies proposées pour les réactions de biotransformation de l'OTA et les structures hypothétiques des intermédiaires réactifs.

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

III.3 Métabolites formés par les cellules durant la toxicité de l'OTA

Le métabolisme de l'OTA a été étudié de façon extensive, *in vitro* et *in vivo*. L'OTA est hydrolysée *in vitro* en OT α et en phénylalanine par les enzymes protéolytiques de la digestion, l' α -chymotrypsine et la carboxypeptidase (Pitout, 1969). *In vivo*, des homogénats pancréatiques de l'iléon et du duodénum de rat sont capables d'hydrolyser l'OTA, tandis que cette activité au niveau rénale ou hépatique est nulle (Suzuki et al., 1977).

Deux épimères hydroxylés, la 4 R-hydroxyochratoxine A (4-R-OHOA) et la 4S-hydroxyochratoxine A (4S-OHOA), sont formés lors de l'incubation de l'OTA en présence de microsomes hépatiques de rat, de porc ou de l'homme. (Stromer et al., 1981). L'épimère 4 (R) de la 4-OH-OTA est majoritairement produit par l'intermédiaire de microsomes de foie humaine et de rat, alors que l'épimère 4 (S) est surtout produit par des microsomes de porc (Stromer et al., 1981). Ces métabolites peuvent aussi être générés par microsomes de reins (Hietanen et al., 1986), les cultures des cellules rénales de singe (Grosse et al., 1995 a) et les cultures de cellules épithéliales branchiales humaines (Pinelli et al., 1999 ; El Adlouni et al., 2000).

L'incubation de l'OTA avec des microsomes de foie de lapin ou de rein de porc conduit à la formation de 10-hydroxyochratoxine A (10-OHOA) (Stromer et al., 1993 ; Petkova Bocharova et al., 2003 b).

La forme ouverte de l'OTA (OP-OA) a été retrouvée *in vivo* dans la bile et l'urine de rat par Li et al., (2000) (Annexe 3).

Une autre voie de métabolisation conduit à l'obtention de la tyrosine-OTA via la phénylalanine hydroxylase (Créppy et al., 1990).

La photoirradiation de l'OTA a généré le couple redox ochratoxine A quinone/ ochratoxine A hydroquinone (OTQ/OTHQ) (Gillman et al., 1998), et récemment, Dai et al., (2002), ont montré, *in vitro*, que l'incubation de l'OTA en présence d'un excès de glutathion réduit aboutissait à la formation d'un conjugué OTQ-glutathion.

Le dérivé OTHQ est retrouvé, *in vivo*, dans l'urine de rat traité par des doses d'OTA de 2 mg/kg de poids corporel durant deux semaines (Mally et al., 2004).

Gross Steinmeyer et al. 2002, ont suggéré la formation dans les hépatocytes primaires humains des conjugués OTA-acyl hexose et -acyl pentose.

L'ochratoxine B, chez le rat est moins toxique que l'OTA et, est métabolisable en 4-hydroxyochratoxine B et ochratoxine β (Stromer et al., 1985).

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

Ces transformations sont dépendantes du système microsomal des mono-oxygénases à cytochrome P-450 (CYP), mais aussi des peroxydases.

Ueno (1985) a montré que, chez le rat, le cytochrome 1A2 est responsable de la formation de l'isomère (R) de la 4-OH-OA, tandis que l'isomère (S) est essentiellement formé par le cytochrome 2B bien que d'autre CYP interviennent.

Les cytochromes P 450 impliqués dans la génotoxicité de l'OTA ont été recherchés par l'utilisation de cellules humaines dans les quelles ont été clonés différents CYP (1A2, 2D6, 2E1 et 3A4) dans tous les cas des adduits ont été observés avec des quantités variant de 1,2 à 87 adduits par 10^9 nucléotides. Le taux le plus élevé d'adduits est obtenu avec le CYP 1A2 (Gross et *al.*, 1995 b et 1997 b). Plus récemment l'implication du CYP 2C9 a été montrée (El Adlouni et *al.*, 2000).

Cependant certaines études suggèrent que l'OTA est faiblement métabolisée par les CYP (Gautier et *al.*, 2001 b) et que sa toxicité dépendrait plus d'un stress oxydatif (Gautier et *al.*, 2001 a ; Zepnik et *al.*, 2001 ; Gross-Steinmeyer et *al.*, 2002).

La figure 6 présente la métabolisation de l'OTA (d'après Manderville et Pfohl-Leszkowicz, 2005).

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

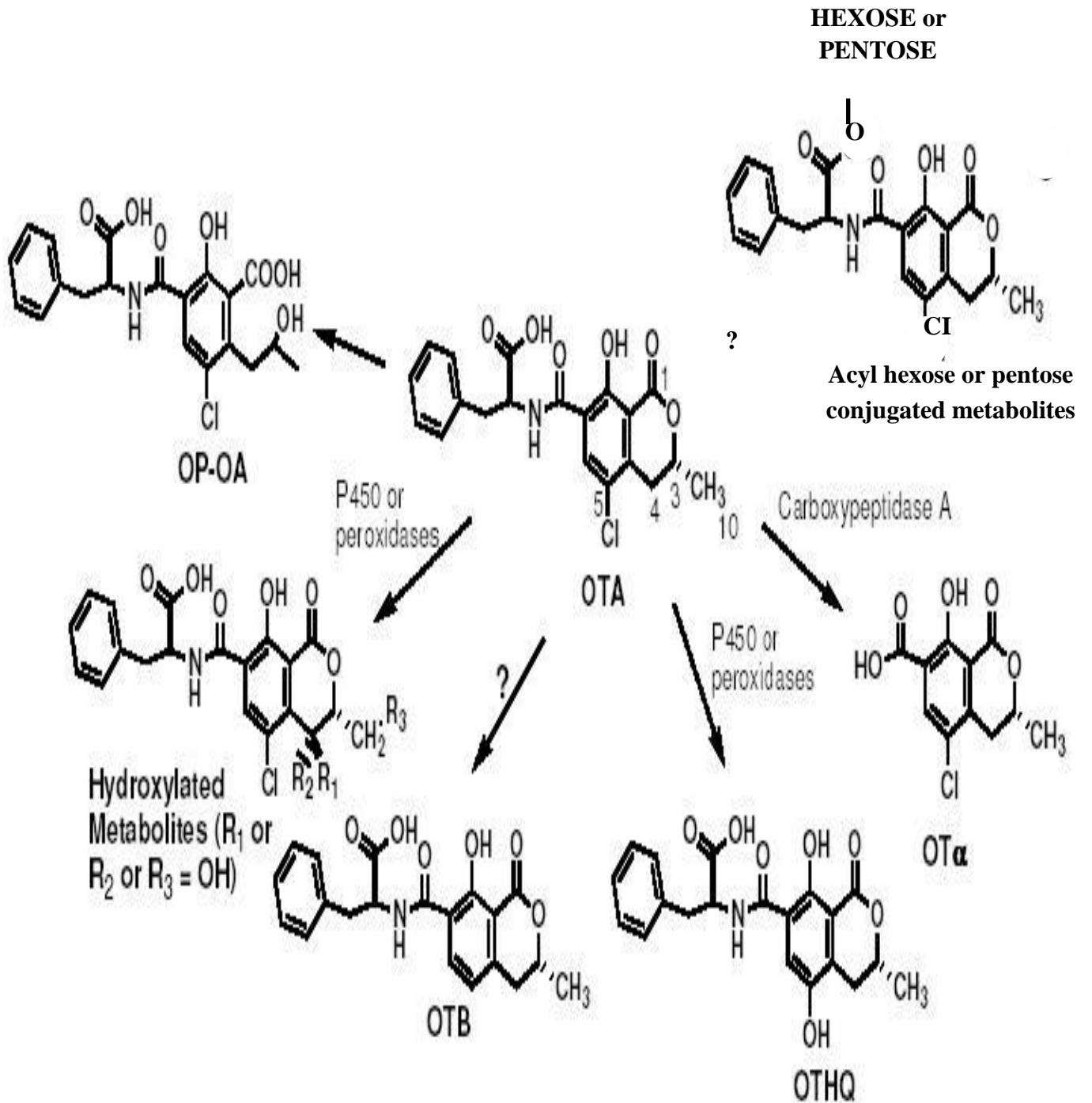


Figure 6 : Schéma de la métabolisation de l'ochratoxine A (d'après Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2005).

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

III . 4 Utilisation des microsomes de porc et de rat pour métaboliser de l'OTA

Les microsomes présentent plusieurs intérêts : facile à préparer et stables à long terme en cryoconservation.

Les microsomes constituent une fraction intracellulaire de tissus (R.E). Ils sont largement utilisés dans les études de métabolisation de xénobiotiques parce qu'ils contiennent des enzymes de leur métabolisation principalement les monooxygénases à cytochrome P450, les peroxydases, enzymes de la cascade de l'acide arachidonique (cyclooxygénase et lipoxygénase) et divers transférases (glutathion-S-transférase).

Les microsomes sont incubés en présence de l'OTA et du cofacteur NADPH (indispensable au fonctionnement des cytochromes P.). En l'absence de l'un des 03 réactifs (microsomes, OTA, NADPH), aucun dérivé n'a été formé (Faucet-Marquis, 2005).

De nombreux métabolites sont formés après métabolisation par les microsomes quantitativement et qualitativement différents, quand ils proviennent du porc ou du rat. Ils ont produit respectivement 23 et 20 dérivés différents sept dérivés ont été identifiés d'après leurs temps de rétention en HPLC : Ce sont l'OT α , L'OP-OA, les 4S et 4R-OHOA, la 10-OHOA, l'OTB et l'OTA-Met (ochratoxine A ester méthyl). (Faucet-Marquis, 2005).

Des recherches avaient indiqué que l'OTA était converti en dérivés 4- et 10- OHOA par les microsomes de foie de plusieurs espèces (Hansen *et al.*, 1982), mais aussi en OTB et trois autres métabolites de structures inconnues (El-Adlouni *et al.*, 2000).

Chez le porc, la formation des métabolites est de fonction de cofacteur utilisé, elle est spécifique de l'organe et de sexe. On observe une métabolisation quantitativement et qualitativement plus importante, en particulier les formes hydroxylées, dans le foie que dans le rein.

Chez le porc, en présence de NADPH, la formation des composés OP-OA, 10-OHOA, et 4R-OHOA est favorisée dans le rein et le foie. Cependant, en présence d'AA, il y a dans tous les cas peu de métabolites visibles à détecter et en particulier la production de 10-OHOA et 4R-OHOA est très faible par contre celle de l'OTB est favorisée par l'AA (Faucet-Marquis, 2005).

La métabolisation chez le rat est quantitativement et qualitativement plus faible que chez le porc. La synthèse des formes hydroxylées de l'OTA est plus importante que chez le rat.

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

Chez le rat, le foie, par rapport aux poumons et aux testicules, est l'organe qui métabolise le plus quantitativement et qualitativement de l'OTA.

In vivo, après 11 mois de traitement, on observe la présence de taux d'OTA dans le foie, le poumon et testicules de rat avec une concentration plus élevée dans les poumons suivie des testicules puis de foie. Ce qui confirme que le foie métabolise plus de l'OTA (Faucet-Marquis, 2005).

En fin, la figure suivante explique la biotransformation des xénobiotiques y compris l'ochratoxine A et sa relation avec la toxicité de leur métabolites.

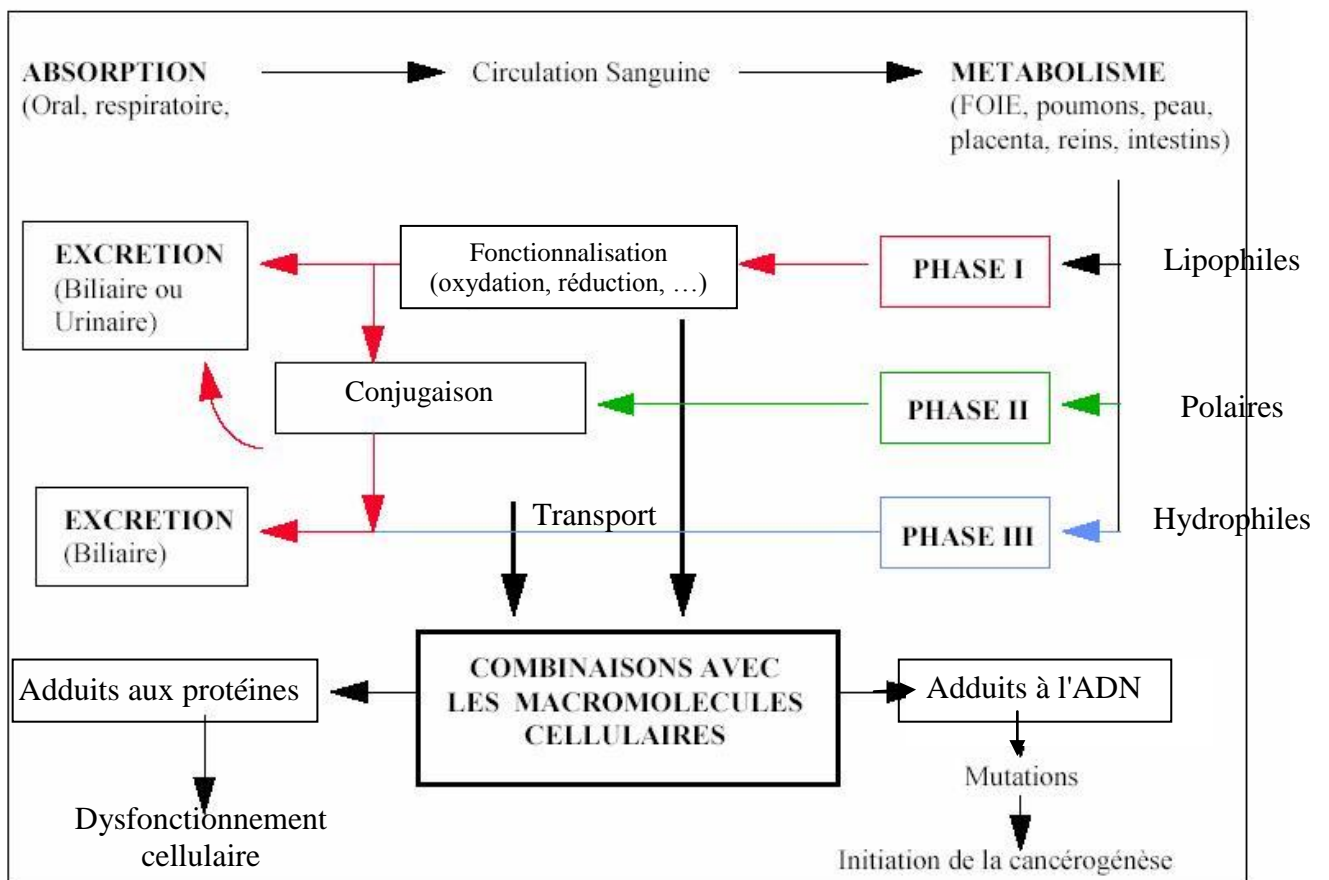


Figure7 : Schéma général de la biotransformation des xénobiotique (sources diverses).

CHAPITRE III : Biotransformation et métabolisation de l'OTA

Conclusion

Parmi les centaines de mycotoxines identifiées, seule une vingtaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupant pour l'humains. Parmi ces mycotoxines on distingue l'ochratoxine A. L'OTA est une molécule produite par différentes espèces fongiques des genres *Aspergillus* et *penicillium* principalement par l'*A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. viridicatum* L'OTA est produite sur les denrées alimentaire au cours de leur stockage et sa production est dépend d'un certain nombre de condition environnementales.

Parmi les gènes identifiés chez *A.ochraceus*, *AokS1*, est responsable de la biosynthèse de l'OTA, cependant, sa voie de biosynthèse n'est toujours bien définie. Jusqu'à présent un nombre très restreint d'études a été réalisé sur la voie de biosynthèse de l'OTA.

L'exposition de l'homme à cette toxine se fait via la chaîne alimentaire incluant les céréales, le café, les cacahuètes, la bière, le vin,... mais aussi les produits carnés et le lait.

L'ochratoxine A est toxique pour l'homme et les animaux et reçoit une attention particulière à cause de ses propriétés néphrotoxiques, tératogènes, carcinogènes et immunosuppressive.

La biotransformation de l'OTA par différents systèmes de métabolisation a permis de mettre en évidence la métabolisation de l'OTA en divers métabolites. La quantité relative de métabolites est en fonction du sexe de l'animale, de l'organe et d'éventuel pré-traitement des cellules ou des animaux par modulateurs de divers enzymes de métabolisation.

Les diverses voies de métabolisation ont comme point commun la formation d'espèces radicalaires et de composées électrophiles pouvant être à l'origine des adduits à l'ADN et aux protéines mais aussi des effets de stress oxydatif dont la lipoperoxydation.