

Les mycotoxines

1- Aflatoxines

2- Ochratoxine A

3- Ochratoxine A (OTA), une toxine néphrotoxique



Introduction

Les ochratoxines sont des métabolites de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* ou *Penicillium*. Leur présence est liée au climat, particulièrement lors de la récolte, et aux conditions de stockage après récolte.

L'ochratoxine A est produite sous les climats froids et tempérés par *Penicillium verrucosum* et par *Aspergillus carbonarius* et en régions chaudes et tropicales par *Aspergillus ochraceus*.

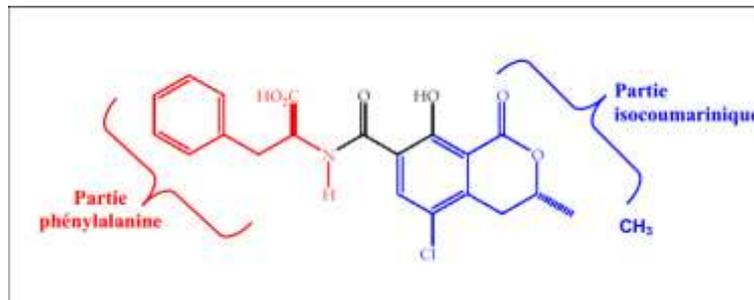
OTA contamine : le café vert, les épices, le cacao, le soja, les cacahuètes, le riz et le maïs, les cereales.

L'ochratoxine A est connue pour sa néphrotoxicité. Elle serait l'un des facteurs potentiels à l'origine de troubles rénaux chez l'homme connus sous le nom de Néphropathie Endémique des Balkans (NEB). Son pouvoir cancérigène est établi chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'homme (classé groupe 2B).

1 Propriétés physiques et chimiques de l'ochratoxine A

L'OTA a été isolée pour la première fois à partir d'*Aspergillus ochraceus* en 1965 par van der Merwe *et al.*.

Elle est constituée d'une molécule de L-phénylalanine engageant son groupement amine dans une liaison pseudo-peptidique avec le groupement carboxyle en C7 de la 7-carboxy-3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine



Sa formule brute est $C_{20}H_{18}ClNO_6$.

Son numéro de CAS est 303-47-9.

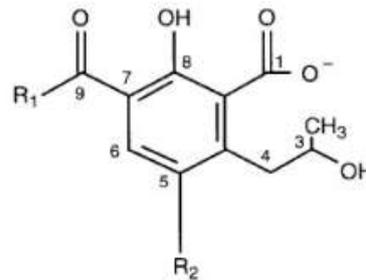
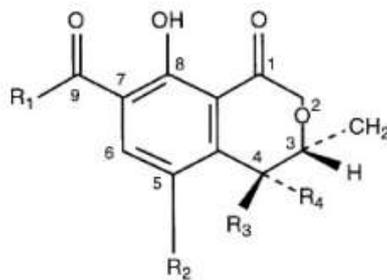
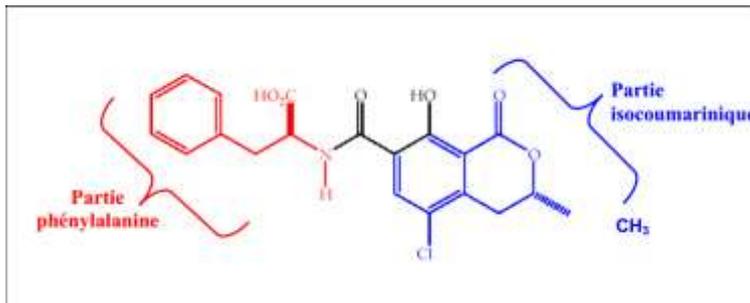
L'OTA pure :

un **solide blanc cristallisé**, de masse moléculaire de 403,8 g/mol (CIRC, 193).

C'est un **acide organique faible** ayant un pKa de 7,1.

A pH acide ou neutre, elle est **soluble dans les solvants organiques polaires** et très peu soluble dans l'eau.

A pH alcalin, elle devient **soluble et stable dans une solution aqueuse de carbonate monosodique** (0,1 M, pH 7,4) ainsi que dans les solutions alcalines aqueuses.



Nom	Abréviation	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ochratoxine A	OTA	Phénylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	OTB	Phénylalanyl	H	H	H	H
Ochratoxine C	OTC	Phénylalanyl, éthyl ester	Cl	H	H	H
Ochratoxine α	OTα	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OTβ	OH	H	H	H	H
4 <i>R</i> -Hydroxyochratoxine A	OTA-OH	Phénylalanyl	Cl	H	OH	H
4 <i>S</i> -Hydroxyochratoxine A	OTA-OH	Phénylalanyl	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxine A	OTA-OH	Phénylalanyl	Cl	H	H	OH
Ochratoxine A ouverte	OP-OTA	Phénylalanyl	Cl	-	-	-

Figure 1 : Structure des différentes ochratoxines et de leurs métabolites : à gauche, ochratoxine et ses analogues (voir le tableau) ; à droite, forme ouverte de l'ochratoxine A (OP-OTA)

Devenir et Propriétés toxicologiques de l'Ochratoxine A

Toxicocinétique

Absorption

L'OTA est d'abord absorbée dans l'estomac en raison de ses propriétés acides ($pK_a = 7,1$) mais l'absorption est aussi possible au niveau de l'œsophage. Le site majeur d'absorption de l'OTA est l'intestin grêle avec une absorption maximale au niveau du jéjunum proximal

Biotransformation

L'OTA est hydrolysée en $OT\alpha$ par la carboxypeptidase A et la chymotrypsine dans les compartiments fermentaires préstomacaux des ruminants et du gros intestin des monogastriques. Les microsomes hépatiques de l'homme, du rat, du cochon et du lapin, incubés avec l'OTA produisent des métabolites mineurs comme les 4R- et 4S-hydroxyochratoxine A (4-OH-OTA); en plus de ces deux métabolites, la 10-hydroxyochratoxine A est retrouvée dans les microsomes de lapin. Les formes isomères de 4-OH-OTA sont considérées comme des métabolites de détoxification

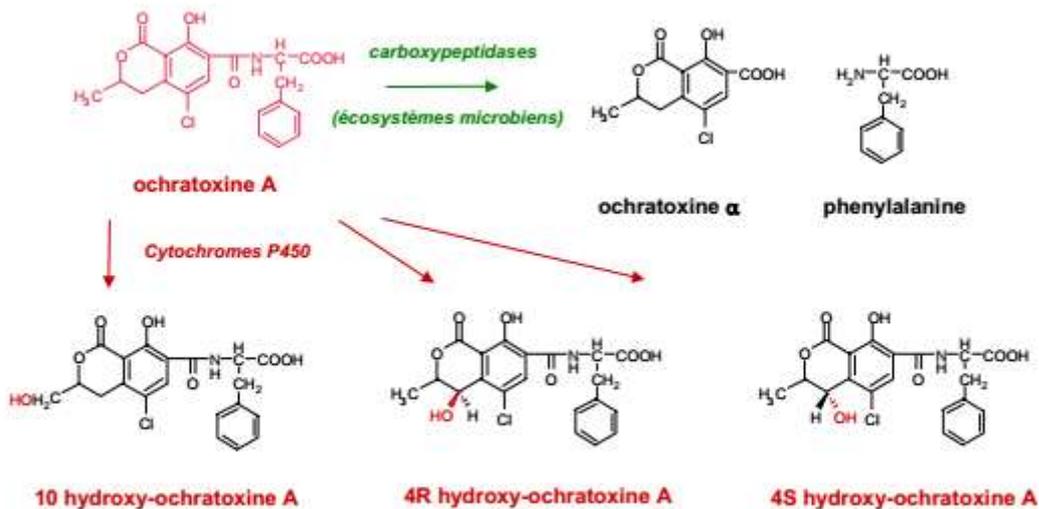


Figure 3 : Voies métaboliques de l'OTA

Distribution

La liaison de forte affinité de l'OTA aux protéines plasmatiques contribue au prolongement de son temps de demi-vie plasmatique. Il a été montré que des protéines de faible poids moléculaire (20 KDa) se lient plus spécifiquement à l'OTA que l'albumine, et qu'elles peuvent facilement traverser le glomérule permettant l'accumulation de l'OTA dans le rein. De l'OTA a été retrouvée dans le sang de cordon ombilical de femmes enceintes démontrant ainsi un passage transplacentaire chez la femme.

Excrétion

Cette toxine est éliminée très lentement de l'organisme, alors que ses métabolites sont éliminés beaucoup plus rapidement. En général, l'OTA, l'Ota et l'OTB sont excrétées dans les urines chez le rat alors que l'OTA-OH est excrétée dans la bile. La réabsorption de l'OTA au niveau des tubules rénaux via des transporteurs anioniques favorise son retour dans le plasma et son accumulation rénale.

Toxicité aiguë

La toxicité aiguë de l'OTA varie en fonction de l'espèce, du sexe mais également en fonction de la voie d'administration de la toxine. L'OTA a de nombreux effets délétères sur différents organes : le rein est l'organe cible de l'action toxique de l'OTA mais celle-ci peut également toucher le foie, le cœur ou les intestins. L'exposition des animaux à l'OTA se traduit, d'un point de vue économique, par des pertes importantes au niveau de la production. On note une réduction de la ponte des poules, accompagnée d'une baisse de la prise d'aliments se traduisant par un gain de poids moindre. Cependant, la toxicité de l'OTA se caractérise plus par une toxicité de type subaiguë, liée à l'ingestion de façon chronique de faibles doses de toxine.

Animal	DL₅₀ (mg/kg poids)	Voies d'administration
Souris femelle	22	administration intrapéritonéale
Rat mâle et femelle	12,6-14,3	administration intrapéritonéale
Souris mâle	51-68	administration orale
Rat mâle et femelle	21,4-30,3	administration orale
Dinde	5,9	administration orale

Tableau: Toxicité relative de l'ochratoxine A

Toxicité subaiguë ou subchronique

Le rein est l'organe cible, mais la toxine a également d'autres effets toxiques (. Des études de toxicité subaiguë chez certains animaux, ont entraîné :

- des anomalies des facteurs de la coagulation chez le rat, avec des hémorragies et des thromboses au niveau de la rate, du cerveau, du foie, des reins et du cœur ;
- des nécroses hépatiques et rénales
- des lésions gastro-intestinales et des lésions des tissus lymphoïdes chez le cobaye
- une myélotoxicité chez la souris
- une fragilité intestinale et des lésions rénales chez le poulet
- une diminution de la production d'œufs chez la poule
-

Génotoxicité

L'OTA est génotoxique dans le test de réparation de l'ADN chez *Escherichia coli* elle augmente le taux d'échanges de chromatides sœurs et elle induit la formation de micronoyaux dans les cultures de cellules de vésicules séminales ovines. OTA induit des cassures mono-brin de l'ADN dans différents tissus ou cellules de souris *in vivo* et *in vitro*.

Pouvoir cancérigène

L'OTA est cancérigène chez le rongeur avec induction de tumeurs rénales, hépatiques, mammaires et testiculaires. Chez l'homme, une corrélation positive entre l'exposition à l'OTA et la NEB ainsi qu'entre la distribution géographique de la NEB et l'incidence élevée des cancers de l'épithélium urothélial a été montrée. Les concentrations sériques d'OTA mesurées sont plus élevées chez les patients atteints de la NEB et/ou du cancer de l'épithélium urothélial que chez les sujets non malades. L'OTA est classée dans le groupe 2B par le CIRC

(1993) comme étant un cancérigène possible chez l'homme

Tableau 1 : Différents effets de l'OTA sur le tube proximal et le tube collecteur (Gekle *et al.*, 1998).

	Tubule proximal	Tube collecteur
Faible dose	Inhibition non compétitive du système de transport des anions organiques Inhibition du système de transport des cations organiques Prolifération cellulaire et hypertrophie Diminution de la réabsorption des protéines	Blocage des canaux ioniques de la membrane plasmatique et de l'échange $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ⁵⁷ Altérations de l'homéostasie du pH et du Cl^- , et du transport transépithélial des électrolytes et H^+ ^{57,77} Activation de ERK1/2 ⁷⁷ Dédifférentiation cellulaire ⁷⁷
Forte dose	Diminution de la viabilité cellulaire Membrane plasmatique perméable Inhibition de la synthèse d'ADN Inhibition de la synthèse protéique Inhibition de la prolifération cellulaire Détachement cellulaire et diminution générale du transport	Diminution de la viabilité cellulaire Membrane plasmatique perméable Inhibition de la synthèse d'ADN Inhibition de la synthèse protéique Inhibition de la prolifération cellulaire Détachement cellulaire et diminution générale du transport

Mécanismes d'action de l'Ochratoxine A

La phase toxicodynamique de l'OTA concerne son interaction avec des cibles cellulaires et moléculaires, responsables d'altérations métaboliques, cellulaires et moléculaires.

- Interaction avec le métabolisme de la phénylalanine

L'ochratoxine A affecte la synthèse des macromolécules cellulaires telles les acides nucléiques mais principalement la synthèse protéique. En raison de son groupement phénylalanine, l'OTA agit comme un analogue structural de cet acide aminé ce qui explique son action sur les voies métaboliques impliquant la phénylalanine.

En effet, l'OTA perturbe la synthèse protéique chez les procaryotes et les eucaryotes par inhibition compétitive de la partie phénylalanine d'une enzyme Phe-tRNA Phe synthétase impliquée dans la réaction d'aminocyclisation du tRNAPhe. Ainsi, l'élongation peptidique est bloquée et la synthèse protéique est arrêtée au niveau post-transcriptionnel.

- Production d'espèces réactives oxygénées et stress oxydant

l'OTA semble réduire de façon significative le taux du glutathion réduit (GSH), un antioxydant non enzymatique, ce qui reflète une altération de la balance oxydoréductrice. Plusieurs travaux ont confirmé davantage l'implication du stress oxydant dans la toxicité de l'OTA en montrant

que le traitement avec des agents antioxydants tels que l' α - tocophérol (vit E), le rétinol, les anthocyanines et l'acide rosmarinique diminue considérablement la toxicité de l'OTA

- **Perturbation de l'homéostasie calcique**

L'augmentation de la peroxydation lipidique membranaire induite par l'OTA perturbe la perméabilité membranaire du calcium, ayant pour conséquences l'altération de l'homéostasie calcique.

Facteurs influençant la teneur en ochratoxine A dans les denrées

- **Moisissures toxigènes**

L'OTA est sécrétée par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. La production est influencée par les conditions de température et d'humidité.

Dans les régions froides et tempérées, l'OTA est principalement produite par *Penicillium verrucosum* ou *P. nordicum*. *P. verrucosum* contamine les produits végétaux notamment les céréales alors que *P. nordicum* est détecté dans les viandes et les fromages.

Dans les régions tropicales et semi-tropicales, l'OTA se trouve synthétisée principalement par *Aspergillus ochraceus*. Par ailleurs, deux autres espèces d'*Aspergillus* ont été rapportées en tant que productrices d'OTA, il s'agit d'*A. niger* et *A. carbonarius*. Le premier contamine principalement les céréales et les oléagineux alors que le second est plutôt rencontré dans le raisin et le café. Ces espèces diffèrent par leurs niches écologiques, les denrées qu'elles contaminent et par leur incidence dans différentes régions géographiques

Espèce productrice	Conditions écologiques	Denrées contaminées	Régions géographiques
<i>Penicillium verrucosum</i>	0°C < θ < 31°C Optimum 20°C aw < 0,8	Céréales, produits céréaliers, viande et abats de porc	Régions froides ou tempérées (Canada, Europe centrale et du Nord)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	8°C < θ < 37°C Optimum 24-31°C aw > 0,79 Optimum 0,95-0,99 2,2 < pH < 10 Optimum 3-10	Denrées stockées et déshydratées: Céréales, amandes, cacahuètes, café noisettes, haricots secs, fruits secs, poisson fumé et séché,	Régions tropicales, subtropicales et méditerranéennes
<i>Penicillium carbonarius</i>	θ < 40°C Optimum 32-35°C aw > 0,82 à 25-30°C	Raisin de table, raisins secs, vin, café	

θ : température ; aw : activité de l'eau

Exposition de l'homme à l'OTA : Evaluation et gestion du risque

- Contamination en OTA des denrées alimentaires et exposition de l'homme

En 1994, la Commission européenne a créé un groupe de coopération scientifique (SCOOP Task) pour rassembler des données sur l'apport d'OTA par le régime alimentaire dans l'Union Européenne. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV. : Fréquence et taux de contamination en OTA de divers aliments (D'après SCOOP Task 3.2.7, European, 2002).

Produits alimentaires	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Pourcentage d'échantillons positifs	Ochratoxine A µg/kg	
				Moyenne 1 ^a	Moyenne 2 ^b
céréales	5180	2825	55	0,294	0,484
Blé	979	273	28	0,269	0,700
maïs	267	35	13	0,165	0,719
Avoine	164	49	30	0,192	0,465
Sorgho	34	24	70	0,136	0,120
Seigle	444	236	53	0,597	1,095
Orge	142	34	24	0,301	1,061
Riz	63	4	6	0,217	0,725
Café vert	1704	620	36	1,620	3,641
Café torréfié^c	1184	549	46	0,724	1,092
Bière	496	192	39	0,028	0,032
Vin	1470	872	59	0,357	0,591
Cacao et dérivés	547	445	81	0,236	0,277
Fruits secs	800	582	73	2,298	3,078
Viande	1860	328	18	0,198	0,830
épices	361	188	52	1,150	5,061
Autres ^d	4927	2472	50	0,197	0,551

a Sur la totalité des échantillons.

b Sur les échantillons positifs

c Inclus café soluble et décaféiné

d Beurre, haricots secs, jus de raisin, huile d'olive etc....

L'ensemble de ces résultats confirme **la présence de l'OTA dans une grande variété de denrées alimentaires**, telles que les céréales, le café, la bière, le vin ou la viande. Les teneurs rencontrées sont variables et peuvent aller de quelques ng/kg (à la limite de quantification), à plusieurs µg/kg. L'OTA a été détectée dans 55 % des échantillons de céréales analysées, à des taux compris entre quelques µg/kg et 33 µg/kg (Danemark). **Le cacao s'est avéré comme la denrée la plus fréquemment contaminée (81 %)**, mais avec des teneurs relativement faibles en OTA (en moyenne 0,277 µg/kg). De même, l'OTA a été mise en évidence dans le sang et les tissus d'animaux d'élevage où elle s'accumule aux niveaux rénal et hépatique.

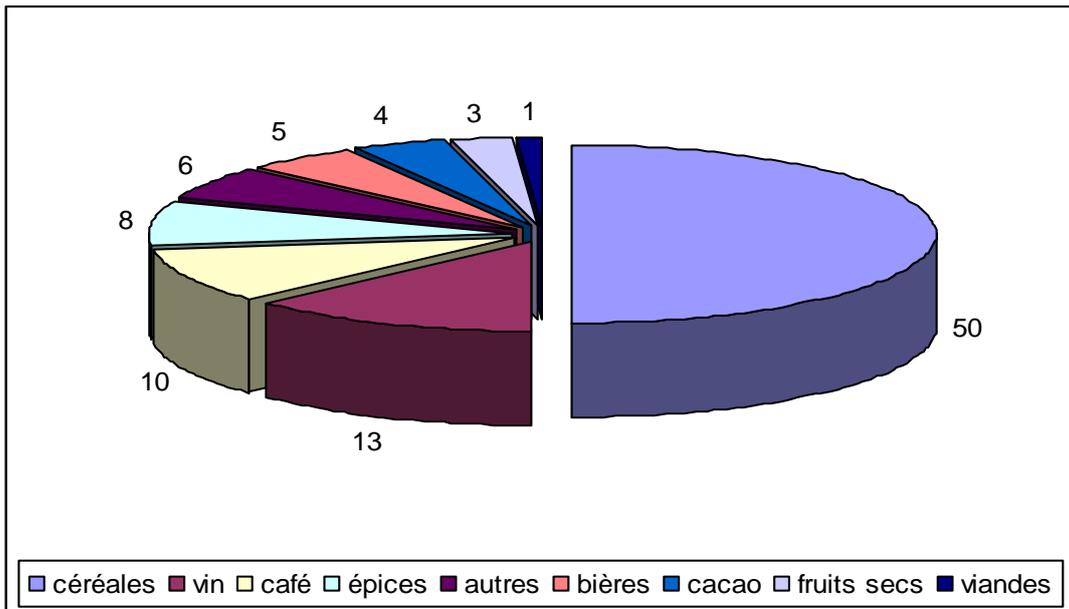


Figure 3 : Contribution de chaque denrée alimentaire dans l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA : céréales (50 %), café (10 %), cacao (4 %). D'après SCOOP Task 3.2.7, European, 2002.

/80

En France,

Le conseil supérieur d'hygiène publique (CSHPF) a réalisé, à partir d'analyses faites par l'observatoire des consommations alimentaires, une évaluation de la part respective de huit produits alimentaires dans la consommation moyenne de l'OTA par l'ensemble de la population française. Il apparaît que 73 % des apports en OTA sont dus au blé, 21 % au maïs, 2 % au riz, 3 % à la charcuterie, 1 % à la viande de porc.

En Côte d'Ivoire

Des études sur la contamination des aliments par l'OTA ont été effectuées par Sangaré *et al.* (2006). **Il ressort de ces études préliminaires que tous les aliments échantillonnés (mil ; maïs ; riz ; arachide) sont contaminés par l'OTA.** Le maïs est l'aliment le plus contaminé avec une moyenne de 870,5 µg/kg. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau V.

Tableau V : résultats de l'analyse préliminaire de l'ochratoxine A dans les aliments en Côte d'Ivoire (Sangaré *et al.*, 2006)

matrices	Etendue des concentrations d'OTA en µg/kg	Concentration moyenne en µg/kg
Mil	17 à 204	110,5
Maïs	3 à 1738	870,5
Riz	9 à 92	50,5
arachide	6 à 64	35

Exposition de l'homme

Suivi des marqueurs d'exposition

Une autre façon d'évaluer l'exposition de l'homme à l'OTA, mise à part l'analyse des taux de contamination en OTA dans les aliments, consiste à rechercher **la présence de la toxine dans les fluides biologiques**. Six pays (Allemagne, Italie, Norvège, Espagne, Angleterre et Suède) ont fourni des analyses de la teneur en OTA dans le sang pour le rapport européen (Miraglia et Brera, 2002). Sur un ensemble de 2712 échantillons de sang, 2419 contenaient des traces d'OTA, 96 avaient des taux allant de 1 à 1,9 ng/ml, 47 étaient compris entre 2 et 5 ng/ml d'OTA, et un seul atteignait le taux de 5,58 ng/ml.

En Côte d'Ivoire

Les études préliminaires portant sur l'OTA contenue dans le sang menées entre 1998 et 2004 par Sangaré *et al.* (2006) ont montré que la contamination de la population par l'intermédiaire des denrées alimentaires est bien réelle. **Les résultats ont révélé que 22 des 63 participants en bonne santé avaient des niveaux d'OTA allant de 0,01 à 5,81µg/l pour une teneur moyenne de 0,83µg/l par rapport aux 8 des 39 patients atteints de néphropathie traités par dialyse dont les niveaux étaient de 0,167 à 2,42 µg/l pour une moyenne de 1,05µg/l (Tableau**

VI). La concentration de l'OTA dans le sang serait en grande partie liée aux habitudes alimentaires de la population en général dominées par les céréales et les arachides.

Tableau VI : teneur en OTA dans le sang à Abidjan (Côte d'Ivoire) (Sangaré et al., 2006)

Catégorie de personne	effectif	Pourcentage de contamination	Etendue $\mu\text{g/l}$	Moyenne en $\mu\text{g/l}$
Patients sains	63	34,9	0,01 à 5,81	0,83
Patients néphropathies	39	20,5	0,167 à 2,42	1,05

Réglementations et recommandations

En 1990, le JECFA a décidé d'établir une dose journalière tolérable hebdomadaire de 112 ng d'OTA par kilogramme de poids corporel, cette valeur ayant été déterminée sur la base des données de néphropathies porcines.

Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, sur la base des études de carcinogénicité, a proposé une exposition journalière tolérable de 5 ng/kg pc/jour, ce qui implique une contamination maximale dans les céréales de 5 $\mu\text{g/kg}$.

Le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine a estimé dans son avis sur l'OTA du 17 septembre 1998, qu'il serait prudent de réduire autant que possible l'exposition à l'OTA, en veillant à ce que les expositions se situent près de la fourchette inférieure des expositions tolérables (comprises entre 1,2 et 14 ng/kg de poids corporel et par jour), soit par exemple en dessous de 5 ng/kg de poids corporel et par jour.

Le règlement CE N° 472/2002 de la Commission du 12 mars 2002 modifie le règlement CE N° 466/2001 fixant des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Ce règlement limite la contamination en OTA dans les céréales brutes, y compris sur le riz et le sarrasin, à 5 μg d'OTA/kg. En ce qui concerne les produits dérivés de céréales, la contamination est limitée à 3 $\mu\text{g/kg}$. Ce règlement fait également état d'une limitation à 10 μg d'OTA/kg de raisins secs. Par la suite, le règlement CE N° 683/2004 du 13 avril 2004 modifiant

le règlement N° 472/2002 a inclus une directive limitant la contamination en OTA à 0,5 µg/kg d'aliment dans les préparations à base de céréales et aliments pour bébés, destinés aux nourrissons et enfants en bas âge, ainsi que dans les aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales pour les nourrissons.

La dernière évaluation de l'OTA a donné lieu au règlement N° 188/2006 modifiant le règlement N° 123/2005 qui prend en compte la contribution d'aliments tels que le vin, les jus de raisin ou le café dans l'exposition de l'homme à l'OTA. Ce règlement ne modifie pas les teneurs maximales établies précédemment sur les céréales ou les raisins. Il inclut une nouvelle directive limitant la contamination en OTA dans les jus de raisin, les vins rouges, blancs, et rosés, ainsi que dans les autres boissons à base de vin ou de moût, à 2 µg/kg. Cette directive vise également à limiter la contamination en OTA dans le café ; celle-ci fixe le taux maximal en OTA à 5 µg/kg dans les grains de café torréfiés et à 10 µg/kg dans le café soluble.

Méthodes d'analyse

Le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires.

- Extraction

L'extraction repose très souvent sur l'utilisation d'un mélange de solvant : un mélange chloroforme – acide phosphorique : café (Battaglia *et al.*, 1996). toluène/HCl/MgCl₂, CHCl₃/ethanol/acide acétique ou encore CH₂Cl₂/H₃PO₄.

- Purification

L'utilisation des colonnes d'immunoaffinité représente l'état de l'art pour la purification d'échantillons contenant de l'OTA. Pour des échantillons plus complexes tels que le café torréfié, une étape de SPE (silice greffée par des groupements phényles) doit être prévue en amont pour éliminer la caféine, interférence perturbant la rétention de l'OTA sur la colonne.

- Séparation et détection

Les immuno-essais, tout particulièrement l'ELISA et la RIA, sont des techniques appliquées en dépistage. Elles ont été utilisées pour doser l'OTA dans des échantillons de rein de porc ou de lait

La chromatographie couche mince (CCM) est aujourd'hui moins utilisée que dans le passé pour déterminer la teneur en OTA dans les aliments, en raison de ses moindres performances en termes de spécificité et de sensibilité.

Une des techniques les plus utilisées est la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique (HPLC-FD).

Enfin, à court terme la LC-MS devrait devenir la technique de référence, en raison de sa capacité à s'adresser à tous les analytes quelles que soient leurs structures chimiques.