

Généralités sur les mycotoxines

Amel Bouslimi

A. Les mycotoxines

Les mycotoxines sont produites par des moisissures, principalement les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Elles peuvent être produites dans les champs, avant la récolte et/ou pendant le stockage des denrées alimentaires et se retrouvent principalement dans les céréales, le café en grains, les haricots, les légumineuses et les fruits secs (Pitt, 2000).

Les mycotoxines sont des petites molécules (PM < 1000 Da) peu solubles dans l'eau et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables, ce qui rend leur élimination difficile et par conséquent, leur accumulation dans les organismes vivants importante. Elles sont responsables de mycotoxicoses; considérées comme des maladies alimentaires, elles ne sont pas infectieuses ni contagieuses (Robb, 1990 ; Hussein et Brasel, 2001).

Les voies de contamination humaine ou animale possibles sont l'ingestion, l'inhalation, le contact cutané et l'allaitement. Les intoxications aiguës sont cependant rares en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. L'intoxication chronique est souvent à craindre en raison d'un effet cumulatif des doses (Gravesen et coll., 1994). La biosynthèse des mycotoxines est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence d'autres micro-organismes en compétition (Etzel, 2002).

L'imprégnation mycotoxique d'une denrée est favorisée par plusieurs facteurs. Il faut distinguer les facteurs intrinsèques liés à l'espèce fongique. En effet, au sein d'une même espèce réputée toxigène, toutes les souches n'ont pas cette propriété. La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques; de même, dans certains cas, une même espèce fongique peut produire plusieurs mycotoxines. Des facteurs biologiques, notamment la coexistence d'autres moisissures, peuvent également affecter la prolifération du champignon et par conséquent la synthèse des mycotoxines. Enfin, des facteurs extrinsèques constitués par l'ensemble des conditions écologiques et qui sont propres à chaque espèce, voire à chaque souche fongique, peuvent influencer fortement la croissance du champignon et sa toxigenèse. Ces facteurs extrinsèques incluent des facteurs physico-chimiques tels que la disponibilité en eau (a_w), la température, la teneur en eau, la composition gazeuse (teneur en O_2 et CO_2) et la nature du substrat (composition en glucides, lipides et protéines).

I. Facteurs influençant la toxinogenese

I.1. Facteurs intrinsèques

Les mycotoxines sont essentiellement élaborées par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* (*A.*), *Fusarium* (*F.*) et *Penicillium* (*P.*). Certaines mycotoxines peuvent être produites par plusieurs espèces appartenant à des genres différents, par exemple l'ochratoxine A est produite par *P. nordicum*, *P. verrucosum* (Olsen et coll., 2003), *A. ochraceus* (Van der Merwe et coll., 1965) et *A. carbonarius* (Wolff, 2000 ; Molinié et coll., 2005). De même, une espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines, par exemple, l'acide pénicillique et l'OTA sont produits par *A. ochraceus*. Cependant, certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques comme les aflatoxines (*A. flavus* et *A. parasiticus*) (Fitzgerald et coll., 1998).

I.2. Facteurs extrinsèques

1. Disponibilité en eau (Aw)

La disponibilité en eau a une influence déterminante sur le développement du champignon ainsi que sur sa production de mycotoxines, notamment dans les denrées peu hydratées comme les céréales, les grains de café (Cahagnier et coll., 1998). La toxinogénèse semble proportionnelle à l'activité en eau. La plupart des moisissures préfèrent une Aw entre 0,85 et 0,99 pour leur développement. L'Aw minimale permettant le développement de la plupart des champignons contaminant les céréales est de 0,7. Certaines moisissures xérophiles (*A. flavus* ou *P. restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, la charcuterie sèche dont l'Aw est moindre (Le Bars et Le Bars, 1987; Bourgeois et coll., 1996). Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales en stockage tandis que les espèces de *Fusarium* préfèrent le milieu dont l'Aw est plus élevée (Pardo et coll., 2004).

2. Température

Les moisissures peuvent se développer entre 0 et 35°C. Certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *fumigatus* jusqu'à 60°C (Bourgeois et coll., 1996). En général, la température optimale de toxinogénèse est voisine de la température optimale de

croissance. Pour d'autres toxines, telles que la zéaralénone élaborée par *F. roseum*, la température optimale de toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance, respectivement 15 et 25°C environ. Parfois, l'apparition de mycotoxine dans les conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1 à 4°C pour les trichothécènes produites par *F. tricinatum* (Pfohl-Leszkowicz, 1999b).

3. Composition gazeuse

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO₂ ont un effet dépresseur important sur la toxinogénèse. La production d'aflatoxines chez l'arachide, modérément réduite entre 5 et 21% d'O₂, n'est pratiquement inhibée que lorsque la proportion en O₂ est inférieure à 1%. L'augmentation de la teneur en CO₂ (20 %), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. Dans une atmosphère confinée, telle qu'elle se présente dans un ensilage mal tassé, *F. roseum* peut encore synthétiser de la zéaralénone. Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse (Le Bars et le Bars., 1987).

4. Nature du substrat du milieu

Un champignon n'est pas forcément capable de se développer sur n'importe quel substrat. Ainsi, l'aflatoxine (AF) ne se forme quasiment jamais dans le soja. Cela est sans doute dû au fait de la présence d'inhibiteurs à l'état de trace comme le zinc ou de protéine de petit poids moléculaire. La composition qualitative et quantitative en certains nutriments (sucre, notamment) influe sur la contamination en AF. L'AF contamine surtout les noix, pistaches, amandes et céréales poussant dans les contrées chaudes (Pfohl-Leszkowicz, 1999a).

La situation aux champs est complexe puisque la croissance d'un champignon peut être influencée par les pratiques culturales. Ainsi le désoxynivalénol contamine le blé d'hiver planté après du maïs, alors qu'il n'y a pas de contamination si la culture s'effectue après une plantation de soja ou d'orge. Les arachides et le soja sont plus fréquemment contaminés par l'OTA formée par *Aspergillus alutaceus* que le colza, le blé ou le maïs, alors que le meilleur substrat pour la production d'OTA par *P. verrucosum* est le maïs (Pfohl-Leszkowicz, 1999b).

La CTN est produite seulement par *P. verrucosum* dans le blé et le maïs. Cette spécificité de substrat provient de différences physiques (activité de l'eau, conductivité thermique, oxygénation) et chimiques (composition en lipides, protéines, acides aminés, acide gras, minéraux).

L'acide phytique diminue la synthèse d'AF alors que la proline stimule la production par *A. parasiticus* et *A. flavus*. De même, 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 (Pfohl-Leszkowicz, 1999b).

5. Facteurs biologiques

Ils sont fondés sur les interactions entre la colonisation de l'espèce fongique toxigène et le substrat. Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres, par exemple l'OTA ou la patuline qui sont produites par différentes espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*; et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines (par exemple, ochratoxine A et citrinine par *Penicillium verrucosum* ; ochratoxine A et acide pénicillique pour *Aspergillus ochraceus* ; citrinine et patuline pour *Penicillium claviforme* ou *Aspergillus terreus*) (le Bars, 1988).

D'autres facteurs d'ordre biologique s'avèrent aussi très importants ; il s'agit des insectes et des acariens qui sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. La contamination d'arachides, de coton, de maïs par *Aspergillus flavus* produisant l'AFB1 avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Durant le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (AFB1, OTA, CTN dans le maïs ou l'orge) (Pfohl-Leszkowicz, 2004).

Par ailleurs, le taux d'AF est souvent moins important lorsque *A. parasiticus* est introduit dans le milieu de culture en même temps que *A. flavus*. Le même phénomène est observé lorsque la souche introduite simultanément est une souche non-toxigène. La présence de *F. moniliforme* dans les épis de maïs protège celui-ci d'une contamination par *A. flavus* et réduit le taux d'AF produit. *F. moniliforme* protège aussi contre la contamination par *F. graminearum* (Bouraima et coll., 1993).

Mislivec et coll. (1988) montrent que lorsque *A. parasiticus* ou *A. ochraceus* poussent en même temps que *A. flavus*, il n'y a pas diminution de la production d'AF. En revanche, la présence de *Penicillia* diminue significativement le taux d'AF. L'inhibition de la production d'AF par *A. flavus* lorsqu'*A. niger* est présent, est due à la synthèse par ce dernier d'un produit inhibant la biosynthèse d'AF. L'OTA à faible concentration (< 0,5 mg/l) n'a d'effet ni sur la croissance d'*A. parasiticus*, ni sur la production d'AF ; par contre, à forte concentration (> 2,5 mg/l), la synthèse d'AF est stimulée. On avance l'hypothèse que l'OTA augmente la production d'AF, parce que, comme l'OTA découple la phosphorylation oxydative, il y a accumulation d'entité acétate, nécessaire à la biosynthèse d'AF. Quand *A. parasiticus* croit en présence de *Streptococclis lactis* ou *Lactobacilllls casei*, la quantité d'AF diminue. Ceci se produit quand la contamination par les deux agents est séquentielle ; en revanche si la contamination débute au même instant, on note une amplification de la production d'AF (Pfohl-Leszkowicz, 1999b).

La présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet inhibiteur sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine.

B. Généralités sur l'ochratoxine A: Mycotoxine Nephrotoxique

En 1965, l'ochratoxine A (OTA) a été découverte pour la première fois chez *A. ochraceus* par des chercheurs sud-africains (Van der Merwe et coll., 1965). Elle est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, etc.) et *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, etc.). Le genre *Aspergillus* est bien adapté pour les climats chauds alors que *Penicillium* se développe bien dans climats tempérés. 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 coll., 1994). Par exemple, l'OTA et ses champignons producteurs ont été trouvés dans les céréales et les produits dérivés, le café, le raisin, etc (Frisvad, 1986; Pohland et coll., 1992; Wolff, 2000; Fazekas et coll., 2002).

I. Structure et propriétés physico-chimiques

L'OTA (Figure 1) est constituée de deux parties importantes, une isocoumarine chlorée (3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine) liée par une liaison amide à la L phénylalanine.

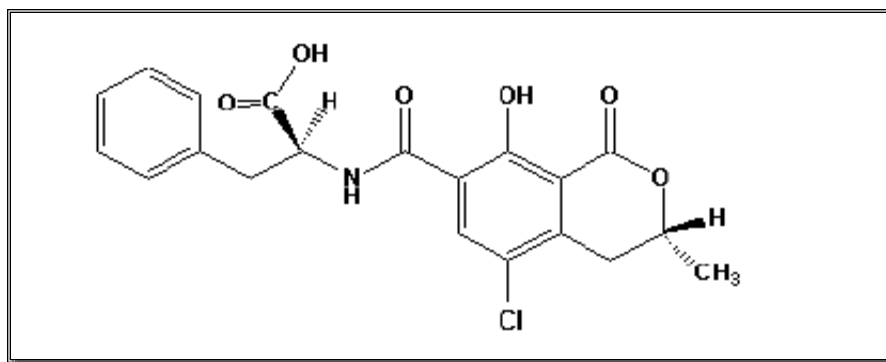


Figure 1. Structure chimique de l'ochratoxine A

L'OTA a un caractère acide faible avec un pka de 4,2 à 4,4 et de 7 à 7,3 respectivement pour le groupement carboxyl de la partie phénylalanine et le groupement hydroxyl de la partie coumarinique (Valenta, 1998). L'OTA est un composé cristallin incolore, de poids moléculaire de 403,8 et de formule brute $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Dans le méthanol, le maximum d'absorption est de 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500. Dans le bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 7,4, le maximum d'absorption est de 378 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 14700. En milieu acide, l'OTA a une fluorescence verte à 365 nm alors qu'en milieu alcalin, elle est bleue à la même longueur d'onde d'émission. Ces propriétés sont mises à profit pour sa détection et son dosage. (IARC, 1993).

A pH acide et neutre, l'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires (alcools, cétones, benzène, chloroforme) mais faiblement soluble dans l'eau et insoluble dans les éthers de pétrole et les hydrocarbures saturés. A pH alcalin, elle est soluble dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ainsi que dans les solutions alcalines en général. Cristallisée dans le benzène, cette molécule possède un point de fusion proche de 90°C ; par contre, ce point s'élève à 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. La particularité de l'Ochratoxine A est due à sa stabilité élevée, elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. Ainsi, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de cette molécule. Müller a démontré en 1982 que l'OTA n'est que partiellement dégradée lors des conditions normales de cuisson. De plus, l'OTA peut résister pendant 3 heures à un autoclavage de 121°C (IARC, 1976) et même à 250°C, sa destruction n'est pas complète (Boudra et coll., 1995). L'irradiation gamma (jusqu'à 7,5 Mrad) d'OTA en solution dans l'éthanol ne provoque aucune dégradation. Cependant, une dégradation est observée dans le cas d'un faible taux d'humidité et

lors d'un traitement en excès d'hypochlorite de sodium (NaOCl) (Castegnaro et coll., 1991). L'exposition à la lumière fluorescente est un facteur de dégradation.

II . Mycologie et toxinogénèse de l'ochratoxine a

L'OTA a été découverte pour la première fois en 1965 (Van Der Merwe et coll., 1965) à l'occasion de recherche systématique de mycotoxines. Dans les régions froides et tempérées, l'OTA est principalement produite par *Penicillium verrucosum* ou *P. nordicum* (Pitt et Hocking, 1997 ; Larsen et coll., 2001 ; Castella et coll., 2002). *P. verrucosum* contamine principalement des produits végétaux notamment les céréales alors que *P. nordicum* est détecté dans les viandes et les fromages (Larsen et coll., 2001). Dans les régions tropicales et semi-tropicales, l'OTA est produite principalement par *Aspergillus ochraceus* (WHO/FAO, 2001 ; Pardo et coll., 2005). La Figure 2 montre les photos de *P. verrucosum* et d'*A. ochraceus*.

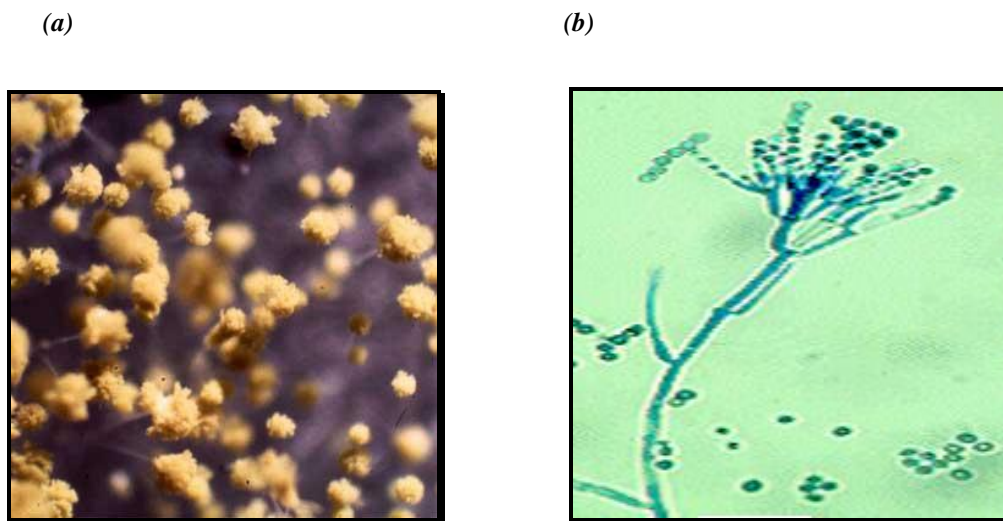


Figure 2. (a) Photos d'*Aspergillus ochraceus* et de (b) *Penicillium verrucosum*

Deux autres espèces d'*Aspergillus* ont été rapportées en tant que productrices d'OTA ; il s'agit d'*A. niger* (Belli et coll., 2004) et *A. carbonarius* (Mitchell et coll., 2004). L'infestation des céréales et des oléagineux serait principalement due à *A. niger* en plus d'*A. ochraceus*

(Accensi et coll., 2004) alors que *A. carbonarius* est plutôt rencontré dans le raisin et le café (Sage et coll., 2002). Ces espèces diffèrent par leurs niches écologiques, les denrées sur lesquelles elles prolifèrent et par leur incidence dans différentes régions géographiques (Tableau 1).

Tableau 1. Niches écologiques des principales espèces productrices d'Ochratoxine A (θ : température ; aw : activité de l'eau)

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

Les voies de biosynthèse de l'OTA par les différentes espèces fongiques ne sont pas complètement précisées. Cependant, des expériences utilisant des précurseurs marqués au C¹⁴ montrent que la partie phénylalanine provient de la voie des acides shikimiques alors que la partie dihydroisocoumarinique provient de la voie des polyketides (Callaghan et coll., 2003 ; Geisen et coll., 2004 ; Ringot et coll., 2006).

III. Contamination naturelle

III.1. Contamination végétale

Les premiers cas de contamination naturelle ont été observés sur du maïs en 1969 (Shotwell et coll., 1969). Par la suite, la toxine a été identifiée dans de nombreux produits végétaux et animaux destinés à l'alimentation humaine et animale, partout dans le monde

(FAO/WHO, 2002 ; CAST, 2003).

L'OTA est un contaminant alimentaire naturel, on la retrouve 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 et les fruits secs (Krogh, 1987; Joosten et *coll.*, 2001). On note sa présence également dans les produits dérivés des céréales (Bacha et *coll.*, 1993; Maaroufi et *coll.*, 1995a). On la retrouve aussi dans la bière (Scott et Kanhere, 1995) et même dans le vin et les jus de raisin (Castellari et *coll.*, 2000). Des cas de contamination de produits végétaux ont été constatés un peu partout dans le monde. Le tableau 2 rend compte de la présence de l'OTA dans les produits végétaux dans différents pays. Dans les Balkans, des niveaux de contaminations considérables ont été mis en évidence dans divers produits céréaliers. Ces niveaux atteignent des valeurs limites de l'ordre de 68900 µg/Kg dans les régions endémiques (Pepeljnak et Cvetnic, 1985).

En Tunisie, la contamination de produits alimentaires à base de céréales a été très souvent observée (Hadidane et *coll.*, 1985; Bacha et *coll.*, 1986, 1988, 1993). Les résultats d'une récente étude ont montré que les échantillons alimentaires analysés sont de 30 à 100% contaminés par l'OTA à des taux allant de 0,2 à 46830 µg/kg (Maaroufi et *coll.*, 1995a ; Maaroufi et *coll.*, 1996 ; Maaroufi et *coll.*, 1999; Zaied et *coll.*, 2009).

Tableau 2. Contamination naturelle des produits végétaux par l'OTA

Pays	Echantillon	Niveau de contamination (µg/Kg)	Références
Tunisie	Raisins céréales	0,59-2,57 8-990	Lasram, 2007 Zaied et <i>coll.</i> , 2009
Corée	Riz	3,9	Park et <i>coll.</i> , 2005
Côte d'Ivoire	Millet Maïs Riz	3-1738 9-92 0,6-64	Sangare-Tigori et <i>coll.</i> , 2006

Croatie	Maïs	1,47	Domijan et coll., 2005
Ethiopie	Blé, Orge, Sorgo	54,1	Ayalew et coll., 2006
Etats Unis	Blé	60	Ngundi et coll., 2006
	Orge	85	
Grand Bretagne	Maïs	2	Scudamore et coll., 1998a
	Riz	3-12	Scudamore et coll., 1998b
	Maïs	1,5	Scudamore et coll. 2000
	Blé, Orge, Avoine	5,2-231	MacDonald et coll., 2004
Houngarie	Blé	0,3-62,8	Fazekas et coll., 2002
	Maïs	1,9-8,3	
	Orge	0,14-212	
Inde	Maïs	0-20	Janardhana et coll., 1999
Italie	Blé	0-4,07	Castoria et coll., 2005
Lituanie	Blé	1,77-3,19	Baliukoniene et coll., 2003
	Orge	0,37-0,92	
Maroc	Figues séchés	0,01-1,42	Zinedine, et coll., 2007b
	Raisins séchés	0,05-4,95	
	Arachides	0,1-2,36	
	Riz	0,02-3,52	Zinedine et coll., 2007a
Pologne	Blé	0,5	Krysinska-Traczyk et coll., 2001
Portugal	Riz	0,09-3,52	Pena et coll., 2005
Russie	Blé, Seigle, Orge, Avoine	200-33300	Aksenov et coll., 2006
Turquie	Blé	0,36-2,23	Baydar et coll., 2005
	Maïs	0,47	
	Riz	0,27	
	Soja	0,57	
	Avoine	4,07	
	Pommes de terre	0,32	
	Lentilles	0,83	

III.2. Contamination animale

La contamination des denrées alimentaires par l'OTA concerne aussi bien des produits destinés à la consommation humaine que des produits pour l'alimentation des animaux, ce qui explique les multiples cas d'ochratoxicooses animales observées. Ainsi, la présence de l'OTA dans le sang et les tissus des animaux exposés a été observée chez plusieurs animaux tels que le veau, le porc et les volailles, ayant consommé des produits contaminés par l'OTA (Mac Donald et coll., 1993 ; Gareis, 1996 ; Jorgensen, 1998 ; Curtui et coll., 2001). Le niveau de contamination de l'animal par l'OTA varie selon l'espèce et selon l'organe. Les organes les plus touchés sont, en ordre décroissant, les reins, le foie, les muscles et le tissu adipeux (Krogh et coll., 1974 ; Harwig et coll., 1983 ; Kane et coll., 1986a, b).

La présence de l'OTA a été, par conséquent, mise en évidence dans de nombreux produits

d'origine animale destinés à l'alimentation humaine tels que le lait, la viande, les oeufs, les fromages et les saucisses (Bauer et Gareis, 1987; Baumann et Zimmerli, 1988; Micco et *coll.*, 1991).

III.3. Contamination humaine

Durant les quinze dernières années, de nombreux travaux ont montré que l'homme est exposé à l'OTA par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire qui transmet l'OTA que l'on retrouve par la suite au niveau du sang (Fuchs et *coll.*, 1991 ; Kuiper-Goodman, 1998; FAO/WHO, 2002).

L'exposition peut être directe (consommation de céréales, oléagineux contaminés) ou indirecte (consommation de viande et de lait contaminés). Par ailleurs, des cas d'intoxication humaine, par inhalation de moisissures ont été également rapportés en Italie (Di Paolo et *coll.*, 1993, 1994). Les premières études relatant la présence d'OTA dans le sang humain ont été effectuées dans les Balkans, dans les années 70. Les taux moyens d'OTA retrouvés varient de 2 à 40ng /ml, avec des valeurs extrêmes de 100ng /ml (Hult et *coll.*, 1982 a). Les taux sériques ainsi que la fréquence d'individus contaminés varient en fonction des régions, des saisons et des années (Petkova -Bocharova et *coll.*, 1988). Le problème de l'ochratoxicose humaine ne concerne pas seulement les pays balkaniques, la Tunisie est également concernée. En effet, plusieurs prospections ont montré la contamination sérique (Bacha et *coll.*, 1993; Maaroufi et *coll.*, 1995b ; Abid et *coll.*, 2003). La dernière étude portant sur 600 individus a montré que 82% d'entre eux sont OTA-positifs avec des taux allant de 0,1 ng/ml à 1136 ng/ml (Maaroufi et *coll.*, 1995b).

Des travaux effectués dans d'autres pays ont révélé des contaminations sériques en OTA considérables, laissant entrevoir qu'il pourrait s'agir d'un problème mondial. Le tableau 3 présente l'ensemble des travaux effectués a permis de constater que la fréquence des personnes OTA-positives est liée à divers facteurs, tels que les zones géographiques et les saisons. Il semble que les zones rurales sont plus touchées que les zones urbaines (Creppy et *coll.*, 1991 ; 1993 ; Maaroufi et *coll.*, 1995a).

Tableau 3. Contamination humaine par l'Ochratoxine A dans certains pays

Pays	OTA (ng/ml) *	Références
------	---------------	------------

Europe	0,1-14,4	Hald, 1991
Slavonski Brod	5-100	Fuchs et <i>coll.</i> , 1991
Croatie	2-50	Radic et <i>coll.</i> , 1997
Tunisie	0.1-1136	Abid et <i>coll.</i> , 2003
France	0,1-6	Creppy et <i>coll.</i> , 1991
Italie	0,12-2,48	Palli et <i>coll.</i> , 1999
Turquie	0,19-1,43	Ozcelik et <i>coll.</i> , 2001
Canada	5,5-19,4	Frohlich et <i>coll.</i> , 1991
Egypte	0-10,15	Wafa et <i>coll.</i> , 1998
Hongrie	---	Solti et <i>coll.</i> , 1997
Tchèque	0,1-13,7	Malir et <i>coll.</i> , 2004
Suède	----	Zimmerli et Dick, 1995
Liban	0,1-8,7	
Egypte	---	Assaf et <i>coll.</i> , 2004

*OTA (ng/ml) : quantité d'OTA en ng par ml de sérum humain

A partir du recensement des données de consommation et de contamination au niveau de plusieurs pays d'Europe, l'exposition des populations européennes a été récemment publiée. Cette étude montre que les principaux vecteurs sont les céréales (44%), suivies des jus de fruits (15%), du vin (15%), du café (9%), de la bière (7%), du cacao et ses dérivés (5%), des fruits secs (4%), de la viande (3%) et des épices (3%) (Miraglia et Brera, 2002).

IV. Toxicocinétique de l'Ochratoxine A

La phase toxicocinétique englobe l'absorption du toxique dans l'organisme et tous les processus ultérieurs : transport par les fluides de l'organisme, distribution et accumulation dans les tissus et les organes, biotransformation en métabolites et excrétion du toxique ou de ses métabolites.

La toxicocinétique de l'OTA a été étudiée dans plusieurs espèces telles que la souris, le rat, le singe et même chez l'homme (Hagelberg et *coll.*, 1989 ; Galtier, 1991; Li et *coll.*, 1997 ; Stander et *coll.*, 2001 ; Studer-Rohr et *coll.*, 2000).

IV. 1. Absorption et distribution

Les valeurs de pka de l'OTA 4,2 à 4,4 et de 7 à 7,3 respectivement pour le groupement carboxyl de la partie phénylalanine et pour le groupement hydroxyl de la partie coumarinique jouent un rôle essentiel dans l'absorption de l'OTA une fois administrée à l'animal par voie

orale, voie naturelle de contamination. En effet, au pH physiologique du duodénum, l'OTA se présente sous forme monoanionique (OTA⁻) ou dianionique (OTA²⁻). Au pH acide de la partie supérieure du tractus gastrointestinal, l'OTA se présente sous forme neutre (OTA⁰). Chez la plupart des espèces animales étudiées, l'OTA est passivement absorbée sous forme neutre OTA⁰ et monoanionique (OTA⁻) à travers la paroi stomacale et au niveau du jujénum (Galtier, 1978 ; Kumagai et Aibara., 1982 ; Roth et *coll.*, 1988). Le pourcentage d'OTA absorbée varie selon les espèces, il est de 66% chez le porc, 56% chez les rat et 40% chez le poulet (Galtier, 1991). L'OTA rapidement absorbée par diffusion passive passe dans la circulation systémique sans aucune modification chimique.

Le suivi des concentrations sériques de l'OTA indique une phase rapide d'absorption et de distribution suivie d'une phase d'élimination très lente. Ceci est dû au fait que dans le sang, la toxine est très liée aux protéines plasmatiques à plus de 99% particulièrement à l'albumine sérique (Chu, 1971, 1974). Le rôle de l'albumine sérique dans la cinétique de distribution de l'OTA a été étudié par Kumagai, (1988) qui a montré que chez des rats déficients en albumine, l'élimination de l'OTA est 20 à 70 fois plus rapide que chez les rats normaux. Les auteurs suggèrent que cette liaison aux protéines plasmatiques ralentit l'épuration rénale, par conséquent, le taux plasmatique d'OTA décroît très lentement (Kumagai., 1985). D'autres protéines sériques non encore caractérisées ont été également trouvées impliquées dans le transport de l'OTA (Schwerdt et *coll.*, 1999). La fraction d'OTA liée à l'albumine et aux autres protéines sériques constitue une réserve mobile de la toxine qui prolonge la demi-vie plasmatique de la toxine. Par ailleurs, l'OTA possède un cycle entérohépatique responsable en partie de sa très longue demi-vie dans l'organisme (Kumagai et Aibara, 1982 ; Fuchs et *coll.*, 1988).

La distribution tissulaire de l'OTA montre qu'elle s'accumule principalement dans le rein, le foie, le muscle et le tissu adipeux selon ce même ordre (Hald, 1991 ; Ferrufino-Guardia et *coll.*, 2000). L'OTA a été également retrouvée à des taux beaucoup plus faibles au niveau du cerveau (Belmadani et *coll.*, 1998). Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence un transfert placentaire actif de l'OTA chez plusieurs espèces (rat, souris, porc) (Appelgren et Arora, 1993 ; Palminger et *coll.*, 1998). Ainsi, la toxine a été détectée dans des œufs de poules nourries avec des céréales contaminés (Fuchs et *coll.*, 1988, Bauer et *coll.*, 1988). Chez l'homme, l'OTA a également été retrouvée au niveau du sang fœtal (Zimmerli et Dick, 1995 ; Miraglia et *coll.*, 1998).

IV. 2. Excrétion

Chez toutes les espèces animales étudiées, les excrétions rénales et fécales jouent un rôle important dans la clairance plasmatique de l'OTA. La contribution de chacune de ces voies dans l'élimination de l'OTA dépend de la voie d'administration, la dose, le degré de liaison aux protéines sériques et de la circulation entérohépatique.

Fortement liée aux protéines plasmatiques, la filtration glomérulaire de l'OTA est limitée. Son élimination dans les urines se fait principalement par sécrétion tubulaire (Sullivan, 1974 ; Stein et *coll.*, 1985). Le transport de l'OTA à travers les cellules tubulaires est assuré par des transporteurs protéiques spécifiques, transporteurs d'anions organiques (AOT). L'OTA est réabsorbée au niveau des différents segments du néphron (Gekle et Silbernagl, 1994 ; Youngblood et Sweet, 2004). La réabsorption de l'OTA filtrée et sécrétée retarde significativement son excrétion et explique sa longue rémanence et son accumulation au niveau du tissu rénal (Gekle et Silbernagl, 1994 ; Groves et *coll.*, 1998 ; Sweet et *coll.*, 2003 ; Youngblood et Sweet, 2004). L'OTA et son métabolite l'OT α sont également excrétés au niveau des fèces par la sécrétion biliaire (Kumagai et Aibara, 1982 ; Berger et *coll.*, 2003).

D'autre part, plusieurs études ont montré un transfert dose-dépendant de l'OTA dans le lait de mammifères traités avec l'OTA avec un *ratio* des concentrations d'OTA lait/plasma variable selon la voie d'administration et la dose administrée, ce *ratio* est de 0,1 à 0,4 (Galtier et *coll.*, 1977 ; Breitholtz-Emanuelsson et *coll.*, 1993 ; Palminger et *coll.*, 1998). Plusieurs auteurs ont rapporté la présence de l'OTA également dans le lait humain (Breitholtz-Emanuelsson et *coll.*, 1993 ; Gareis et *coll.*, 1988 ; Micco et *coll.*, 1995 ; Skaug et *coll.*, 2001).

IV. 3. Biotransformation

La biotransformation de l'OTA n'est pas complètement élucidée, plusieurs métabolites sont identifiés *in vitro* et/ou *in vivo*, alors que d'autres restent à caractériser. L'étude des différentes voies de métabolisation de l'OTA s'avère très importante dans la mesure où des différences significatives des effets toxiques induits par l'OTA sont observées selon que le modèle expérimental inclut ou non un système d'activateurs exogènes (microsomes hépatiques ou rénaux, cellules primaires, etc).

□ Hydrolyse

L'hydrolyse constitue la voie métabolique majeure de biotransformation de l'OTA. Il

s'agit aussi du premier processus de biotransformation, l'OTA peut être en effet hydrolysée avant même d'être absorbée au niveau de l'intestin grêle, du colon, du pancréas et dans une moindre mesure, au niveau du foie et le rein après absorption. La flore microbienne du tractus gastro-intestinal joue un rôle essentiel dans la catalyse de ces réactions (Galtier et Alvinerie, 1976 ; Galtier, 1999 ; Madhyastha et *coll.*, 1992). Cette hydrolyse constitue une voie de détoxification dans la mesure où les dérivés obtenus, la phénylalanine et l'OT α ne sont pas toxiques.

Après absorption et distribution, l'OTA est métabolisée principalement au niveau du foie par des réactions de phase I et de phase II. Ces réactions peuvent être soit des réactions de détoxification qui produisent des dérivés beaucoup moins toxiques que l'OTA voire non toxiques, soit des réactions de bioactivation qui augmentent le potentiel toxique de la toxine.

□ Réactions de phase I

Un schéma résumant l'ensemble de ces réactions est présenté à la Figure 3. Les réactions de détoxification incluent en plus du clivage de l'OTA en OT α (Hydrolyse), des réactions d'hydroxylation par le système microsomal des monooxygénases à Cytochrome P450 mises en évidence chez différentes espèces (homme, porc, rat, etc). Le principal dérivé hydroxyl de l'OTA est le 4-OH-OTA avec deux épimères 4(R)-OH-OTA et le 4(S)-OH-OTA (Oster et *coll.*, 1991 ; Omar et *coll.*, 1996). Plusieurs études ont montré que ces deux épimères ne sont pas toxiques (Hutchison et Steyn, 1971 ; Moroi et *coll.*, 1985). Un autre dérivé hydroxyl a été identifié, le 10-OH-OTA il s'agit également d'un dérivé non toxique (Xiao et Marquardt, 1996 ; Pinelli et *coll.*, 1999 ; Zepnik et *coll.*, 2001).

Dans le cadre de ces réactions de détoxification, l'OTA peut être également transformée en son dérivé déchloriné, l'OTB, qui est aussi un contaminant naturel de la famille des Ochratoxines. Des études toxicologiques ont montré que l'OTB est 10 fois moins toxique que l'OTA (Chu et *coll.*, 1972 ; Grosse et *coll.*, 1997 ; Kasmuller et *coll.*, 2004).

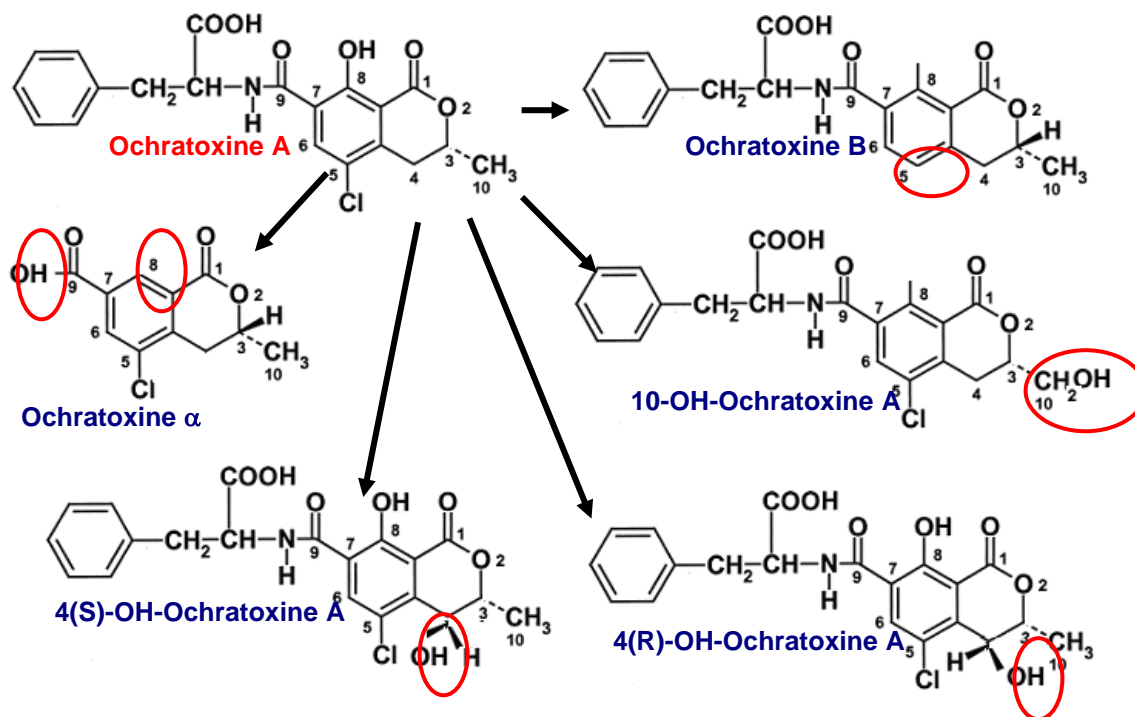


Figure 3. Réactions de biotransformation (phase I) de l'ochratoxine A

Ces différents produits de métabolisation (4-OH-OTA, 10-OH-OTA, O α , OTB) étant nettement moins toxiques que l'OTA elle-même, elles ne peuvent pas expliquer le large spectre de la toxicité de l'OTA ; d'autres dérivés très réactifs tels que le O-CH₃-OTA (Figure 6) (Hoehler et *coll.*, 1996 ; 1997) et les dérivés quinones OTAQ/OTAHQ (Figure 7) résultant de l'oxydation chimique et enzymatique peuvent être à l'origine des effets toxiques de l'OTA, notamment la production de radicaux libres (Calcutt et *coll.*, 2001 ; Schaaf et *coll.*, 2002 ; Russo et *coll.*, 2005 ; Simarro Doorten et *coll.*, 2006).

□ Réactions de phase II

Les réactions de Phase II sont des réactions de conjugaisons et constituent d'une manière générale une voie de détoxification. L'OTA est essentiellement transformée par des glucurono- et sulfoconjugaisons, réactions catalysées respectivement par l'uridine-diphosphate glucuronosyl-transférase et la sulfo-transférase. Ces réactions ont principalement lieu au niveau du foie (Roth et *coll.*, 1988 ; Li et *coll.*, 1997 ; Chandrasekharan et *coll.*, 2002). D'autres conjugués O-ester-OTA ont été identifiés, il s'agit plus exactement de conjugués pentose et

hexose (Gross-Steinmeyer et *coll.*, 2002 ; Zepnik et *coll.*, 2003).

V. Mécanismes d'action de l'ochratoxine A

V. 1. Interaction avec le métabolisme de la Phénylalanine

Parce qu'elle contient la moitié Phénylalanine (Phe), l'OTA est un analogue structural de cet acide aminé et par conséquent agit sur plusieurs voies métaboliques impliquant la Phe. Ainsi, l'OTA affecte la synthèse protéique chez les procaryotes et les eucaryotes *in vitro* et *in vivo* par inhibition compétitive vis-à-vis de la Phe dans l'aminocyclation du tRNA^{Phe}; par conséquent, l'élongation peptidique est stoppée et la synthèse protéique est arrêtée au stade post-transcriptionnel (Könrad et Rösenthaller, 1977 ; Creppy et *coll.*, 1983b ; 1986 ; Dirheimer et Creppy, 1991).

Cette inhibition de la synthèse protéique a été considérée comme la cause majeure de la toxicité de l'OTA. Cependant, des travaux ultérieurs ont montré que 4(R)-OH OTA et l'OTB sont très faiblement toxiques, voire non toxiques (Creppy et *coll.*, 1983a ; Bruinink et *coll.*, 1997). Le fait que des modifications mineures de partie isocoumarinique de l'OTA provoquent des différences significatives de la toxicité de l'OTA suggère que c'est plutôt la partie isocoumarine et non la Phe qui est primordiale pour la toxicité de l'OTA.

En conséquence, à l'inhibition de la synthèse protéique, l'OTA perturbe plusieurs enzymes cellulaires et particulièrement la phospho-enol-pyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK), enzyme clé de la régulation de la voie de néoglucogenèse (Meisner et Meisner, 1981 ; Meisner et Krogh, 1986a ; Meisner et Polsinelli, 1986b).

Outre son interaction avec la réaction d'aminocyclation du tRNA^{Phe}, l'OTA inhibe la Phe-hydroxylase hépatique. L'hydroxylation irréversible de la Phe en Tyr est une étape clé de la régulation du catabolisme de cet acide aminé. En effet, une dégradation trop rapide épuiserait rapidement la Phe et au contraire, son accumulation inhiberait la synthèse de dérivés de Phe (Maladie de phénylcétonurie : déficiences intellectuelles et troubles neurologiques). La tyrosine-OTA (Tyr-OTA) a été retrouvée au niveau du foie d'animaux intoxiqués (Creppy et *coll.*, 1990) ; ainsi, la partie Phe de l'OTA peut se fixer sur le site d'action de la Phe-hydroxylase, lui servir de substrat et inhiber son action (Richardson et Fisher, 1993).

V. 2. Production d'espèces oxygénées réactives et stress oxydant

Comme on vient de le signaler, l'inhibition de la synthèse protéique, à elle seule, ne peut pas expliquer les divers effets toxiques de l'OTA. Plusieurs travaux suggèrent l'implication d'un stress oxydo-reducteur dans la toxicité de l'OTA. L'induction du stress oxydant par l'OTA a été prouvée par plusieurs investigations. En plus de la mise en évidence de radicaux libres, la lipoperoxydation a été observée *in vivo* et *in vitro* (Gillman et *coll.*, 1999 ; Hoehler et *coll.*, 1996 ; 1997; Rahimtula et *coll.*, 1988 ; Baudrimont et *coll.*, 1997). D'autre part, le dommage oxydatif à l'ADN a été également mis en évidence par le dosage du 8-oxo-guanosine (8-oxo-dG) et la recherche des bases oxydées de l'ADN (Gautier et *coll.*, 2001 ; Schaaf et *coll.*, 2002 ; Kamp et *coll.*, 2005). L'OTA induit également une diminution significative du taux du GSH, antioxydant cellulaire majeur (Schaaf et *coll.*, 2002 ; Kamp, 2005). Des études utilisant les puces à ADN ont montré que dans des cellules tubulaires rénales, l'OTA induit l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (hypoxia-inducible factor 1, catalase) (Lühe et *coll.*, 2003).

Actuellement, le stress oxydant est considéré comme le mécanisme primordial de la toxicité de l'OTA puisqu'il est souvent mis en évidence à un stade précoce de la toxicité de l'OTA et avec des concentrations de l'ordre de nanomolaire (Schilter et *coll.*, 2005). Cette implication du stress oxydant dans la toxicité de l'OTA a été davantage confirmée par plusieurs travaux qui montrent que le traitement avec des agents antioxydants tels que la mélatonine, la Vitamine E, la Vitamine C et les polyphénols diminuent considérablement la toxicité de l'OTA (Grosse et *coll.*, 1997 ; Baldi et *coll.*, 2004 ; Okutan et *coll.*, 2004 ; Guerra et *coll.*, 2005)

V. 3. Génotoxicité et cancérogenèse

La génotoxicité de l'OTA a été démontrée par des essais d'induction de la synthèse non programmée de l'ADN, le test d'échange de chromatides sœurs, l'induction des aberrations chromosomiques et par la détermination de l'index mitotique (Follmann et *coll.*, 1995 ; Dorrenhaus et *coll.*, 2000 ; Lioi et *coll.*, 2004). L'étude de l'induction de l'activité de réparation SOS du DNA, chez *E. coli* PQ 37, a montré que l'OTA induit la réponse SOS, en l'absence d'activateur exogène (Malaveille et *coll.*, 1991, 1994). De plus, l'OTA induit la production de

micronoyaux *in vivo* et *in vitro* (Dopp et coll., 1999 ; Degen et coll., 1997, Robbiano et coll., 2004) et plusieurs autres dommages à l'ADN, notamment des cassures simples et doubles brins mis en évidence par le test de Comet (Lebrun et Follmann, 2002 ; Kamp et coll., 2005 ; Russo et coll., 2005 ; Simarrio Doorten et coll., 2006).

La formation d'adduits à l'ADN par l'OTA n'est pas définitivement prouvée. Des études ont montré que l'OTA forme des adduits à l'ADN d'une manière dose et temps dépendants *in vivo* dans plusieurs organes de souris et de rat (Pfohl-Leszkowicz et coll., 1993 ; Pfohl-Leszkowicz et coll., 2002, Faucet et coll., 2004) et *in vitro* dans différentes lignées cellulaires en présence de microsomes de foie et de rein (Grosse et coll., 1995, 1997 ; Obrecht-Pflumio et Dirheimer, 2000). Toutes ces études ont utilisé la technique dite « de postmarquage au ³²P ». Plusieurs autres études se basant sur d'autres techniques plus sensibles (CSL, CL/SM/SM, SMA) n'ont pas réussi à trouver des adduits de l'OTA ni *in vivo* ni *in vitro* (Mally et coll., 2004; Zepnik et coll., 2003 ; Schlatter et coll., 1996 ; Gautier et coll., 2001 ; Dai et coll., 2003 ; Mally et coll., 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les adduits observés par la technique de postmarquage radioactif seraient des artéfacts non spécifiques ni de l'OTA ni de ses métabolites.

D'autres travaux ont montré que l'OTA à faible concentration perturbe significativement le cycle cellulaire en diminuant le nombre des cellules en phase S et en augmentant le nombre des cellules en G0/G1 et G2/M (O'Brien et coll., 2001; Kamp et coll., 2005). L'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 peut être expliqué par l'induction de dommage à l'ADN (Choisy-Rossi et Yonish-Rouach, 1998).

Quant à la mutagénicité de l'OTA recherchée par les différents tests standards, les résultats se sont révélés négatifs (Wehner et coll., 1978 ; Bendele et coll., 1985 ; Wurgler et coll., 1991). D'autres travaux ont montré des effets mutagènes sur des souches de *Salmonella typhimurium* TAI 535, TAI 538 et TAI 00, exposées à l'OTA en présence de microsomes de foie ou reins (Hennig et coll., 1991 ; Obrecht-Pflumio et coll., 1999).

Si les données concernant la génotoxicité et la mutagenèse de l'OTA sont encore controversées, la cancérogenèse de l'OTA est un fait prouvé, l'OTA est classée en catégorie 2B : cancérogène probable pour l'homme (IARC, 1999). L'OTA induit des tumeurs rénales et du tractus urinaire chez toutes les espèces animales étudiées même après exposition à des faibles doses (de l'ordre de 70µg/kg p.c.). De plus, des hépatomes et des adénomes mammaires ont été

observés chez plusieurs espèces particulièrement le rat et la souris traités avec l'OTA. Il faut noter que pour les différentes espèces étudiées, les mâles ont été trouvés beaucoup plus sensibles que les femelles (Bendele et *coll.*, 1985; Boorman, 1989 ; NTP, 1989; Mantle et *coll.*, 2005).

V. 4. Perturbation de l'homéostasie calcique

La lipoperoxydation membranaire induite par l'OTA perturbe la perméabilité membranaire du calcium et perturbe ainsi l'homéostasie calcique en augmentant son influx à travers la membrane cytoplasmique, sa libération des réserves intracytoplasmiques et en modulant le fonctionnement des canaux calciques (Khan et *coll.*, 1989 ; Chong et Rahimtula, 1992 ; Dopp et *coll.*, 1999). Les travaux de Hoehler et *coll.* (1996 ; 1997) suggèrent que l'accumulation intracellulaire du Ca^{2+} avec la présence de l'OTA peuvent participer au découplage de la phosphorylation oxydative et donc à la libération des électrons de la chaîne respiratoire provoquant ainsi la production de radicaux libres. Benesic et *coll.* (2000) ont montré que l'OTA perturbe l'homéostasie calcique et celle de l'AMPc dans des cellules humaines du tubule proximal rénal à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Ils ont montré que l'OTA interfère avec la signalisation hormonale dépendante du calcium menant ainsi à l'inhibition de la prolifération cellulaire.

V. 5. Inhibition de la respiration mitochondriale

La perturbation du fonctionnement mitochondrial est un événement précoce durant l'intoxication par l'OTA (Aleo et *coll.*, 1991). Plusieurs travaux ont montré que l'OTA réduit la respiration mitochondriale et donc la production d'ATP et altère la morphologie mitochondriale (Meisner et Chan, 1974 ; Wei et *coll.*, 1985).

V. 6. Transduction des signaux cellulaires

L'OTA, comme plusieurs xénobiotiques, peut exercer sa toxicité par des mécanismes non génotoxiques mais qui affectent épigénétiquement le contrôle de l'expression de certains gènes. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que l'OTA active certaines MAPKs, l'ERK, la p38 et la c-JNK (Horvath et *coll.*, 2002 ; Sauvant et *coll.*, 2005) et induit la synthèse et la libération du facteur de nécrose tumoral (TNF α cytokine apoptotique (Weidenbach et *coll.*, 2000 ; Petzinger et Weidenbach, 2002; Al-Anati et *coll.*, 2005).

V. 7. Cytotoxicité

Les dommages cellulaires induits par l'OTA peuvent mener à la mort cellulaire ou cytotoxicité s'ils ne sont pas réparés ou contrecarrés. La mort cellulaire induite par l'OTA a été observée *in vivo* chez plusieurs espèces animales et *in vitro* dans différents types cellulaires (Wei et Sulik, 1993 ; Atroshi et *coll.*, 2000 ; Doorten et *coll.*, 2004 ; Gekle et *coll.*, 1998).

Selon le degré de l'atteinte toxique, la cellule exposée à l'OTA peut mourir par nécrose ou par apoptose ; en effet, des figures de nécrose ont été observées *in vivo* et *in vitro* (Atroshi et *coll.*, 2000 ; Sauvart et *coll.*, 2005) ; par ailleurs, plusieurs types cellulaires traités avec l'OTA ont montré des figures apoptotiques classiques avec condensation du matériel génétique et du cytoplasme et fragmentation de l'ADN (Seegers et *coll.*, 1994). Des concentrations nanomolaires d'OTA ont induit l'activité Caspase 3, la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine (Ueno et *coll.*, 1995 ; Gekle et *coll.*, 2000). L'utilisation de la technique des puces à ADN a montré que l'OTA module la transcription des gènes impliqués dans l'apoptose (annexine V et clusterine) (Lühe et *coll.*, 2003).

Schwerdt et *coll.*, (2004) ont montré que l'apoptose induite par l'OTA ne dépend pas de la voie mitochondriale ni de la libération du cytochrome C ; ils ont noté, par contre, une corrélation nette entre le pH intracellulaire et la modulation de l'activité Caspase 3. L'étude du rôle du stress oxydant dans l'induction de l'apoptose a montré que ce dernier accompagne le processus apoptotique mais il n'est pas déterminant pour l'induction de l'apoptose. Les radicaux libres produits par l'OTA n'interviennent pas dans l'induction de l'apoptose (Atroshi et *coll.*, 2000 ; Petrik et *coll.*, 2003). Le mécanisme exact par lequel l'OTA déclencherait le processus apoptotique n'est pas encore élucidé.

VI. Toxicité de l'Ochratoxine A

VI.1. Néphrotoxicité

La néphropathie tubulo-interstitielle constitue l'effet majeur de l'OTA décrit, elle se caractérise par une tubulo-néphrite interstitielle (Krogh et *coll.*, 1974 ; Kane et *coll.*, 1986a ; Krogh, 1992) qui évolue lentement chez l'homme vers l'insuffisance rénale. La néphropathie de ce type la plus largement décrite est la Néphropathie Endémique des Balkans où l'agent suspecté très fortement est l'OTA (Krogh, 1979 ; Hult et *coll.*, 1982a, b ; Petkova-Bocharova et

coll., 1988 ; Castegnaro et *coll.*, 1990).

VI. 2. Immunotoxicité

Le système immunitaire semble être une cible très sensible à l'action de l'OTA. En effet, l'OTA affecte à la fois la réponse humorale et la réponse cellulaire (Harvey et *coll.*, 1992 ; Marin et *coll.*, 1996 ; Muller et *coll.*, 1999). Elle a un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes (T et B), les macrophages et les cellules tueuses NK (Creppy et *coll.*, 1982a, 1983a ; Dwivedi et Burns, 1985 ; Luster et *coll.*, 1987 ; Lea et *coll.*, 1989). Elle inhibe la production d'anticorps (diminution des IgM, IgG) *in vivo* et *in vitro*, sur des lymphocytes en culture (Creppy et *coll.*, 1982b).

VI. 3. Teratogenicité

L'OTA traverse la barrière placentaire, ce qui explique les multiples malformations observées chez les fœtus des animaux exposés à l'OTA tels que le rat, la souris, le hamster, le chien et le poulet (Brown et *coll.*, 1976 ; Arora et Froelen, 1981 ; Mayura et *coll.*, 1982, 1984 ; Wei et Sulik, 1993).

Par ailleurs, l'OTA affecte le développement du système nerveux. Il semble qu'au début de l'organogenèse, le système nerveux central constitue la cible principale de l'OTA (Arora et Froelen, 1981 ; Fukui et *coll.*, 1992 ; Belmadani et *coll.*, 1998).

VI. 4. Cancérogénicité

L'OTA, agent génotoxique et très probablement mutagène peut également être à l'origine de l'enclenchement d'un processus cancéreux. Plusieurs travaux ont montré, chez le rat et la souris, après intoxication chronique à l'OTA, l'existence d'adénomes et de carcinomes rénaux (Kanisawa et Suzuki, 1978 ; Bendele et *coll.*, 1985 ; Boorman, 1989 ; Huff, 1991) ; cela confirme l'implication de la toxine dans les cancers du tractus urinaire observés dans les régions endémiques des Balkans (Castegnaro et Chernozemsky, 1987). Des travaux plus récents ont montré l'implication de l'OTA dans la genèse du cancer de testicules (Schwartz, 2002).

C. Généralités sur la citrinine : Mycotoxine Néphrotoxique

La citrinine a été isolée pour la première fois en 1931 à partir de *Penicillium citrinum* (Hetherington et Raistrick, 1931 ; Frisvad, 1986). Plus tard, de nombreuses souches des genres

Penicillium et *Aspergillus* productrices de CTN ont été identifiées (Ei-Banna et Leistner, 1987 ; Kurata, 1990) y compris *P. camemberti* (utilisée pour la production du fromage) et *A. oryzae* (utilisée pour la production du saké, de la sauce de soja) (Manabe, 2001). Plus récemment, la CTN a été (Blanc et coll., 1995 ; Li et coll., 2003) isolée à partir de plusieurs souches du genre *Monascus* y compris *M. ruber* et *M. purpureus*, souches industrielles utilisées pour la production de pigments rouges (Blanc et coll., 1995). Les genres *A. niveus*, *A. terreus* (Figure 14), *P. citrinum* et *Monascus* sont considérés comme étant les meilleurs producteurs de CTN (Wang et coll., 2005).

I- Structure et propriétés physico-chimiques

La citrinine (CTN) (Figure 4) est un métabolite secondaire qui a été isolé pour la première fois à partir de *Penicillium citrinum* (Hetherington et Raistrick, 1931). Elle a tout d'abord été identifiée en temps qu'antibiotique pour ses propriétés bactéricides vis-à-vis des bactéries à Gram positif (Raistrick Smith, 1941; Timonin et Rouatt, 1944). Cependant, sa toxicité a empêché son utilisation en médecine humaine (Ambrose et De Eds, 1945, 1946). La citrinine est un polykétide, composé d'une unité coumarique. Sa formule chimique est l'acide 4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-triméthyl-6-oxo-, (3Rtrans)-3H-Benzopyran-7-carboxylique.

La CTN est un composé cristallin jaune, de poids moléculaire de 250,24 et de formule brute $C_{13}H_{14}O_5$. A pH acide, la CTN prend la couleur jaune alors qu'à pH alcalin, elle devient rouge. La CTN est très soluble dans le solvant organique polaire et peu soluble dans l'eau (Deshpande, 2002). La CTN absorbe la lumière ultraviolette dans l'éthanol, le maximum d'absorption est à 319 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 47000.

Dans le méthanol, le maximum d'absorption est entre 250 et 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5490. Dans le chloroforme, le maximum d'absorption est à 332 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 16100.

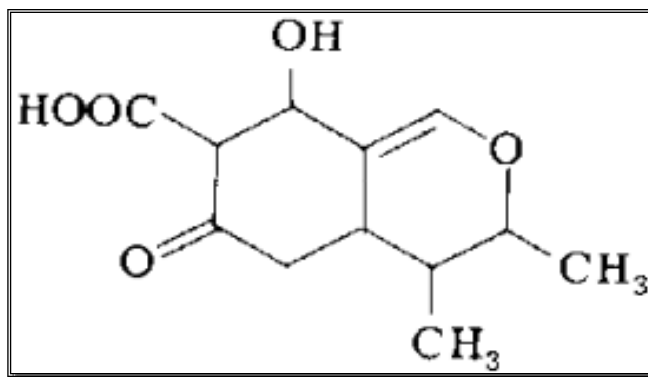


Figure 4. Structure de la citrinine

II . Mycologie et toxinogènèse de la citrinine

De nombreuses souches de champignons inférieurs productrices de CTN ont été identifiées. La production de CTN est confirmée pour plus d'une douzaine de moisissures (Tableau 4) ; néanmoins, la liste reste incomplète. Les genres *Aspergillus niveus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium citrinum* et *Monascus* sont considérés comme étant les meilleurs producteurs de CTN (Wang et coll., 2005) (Figure 5).

Tableau 4. Principales moisissures productrices de Citrinine

Espèces	Références
<i>Aspergillus niveus</i>	Raper et Thon, 1949
<i>Aspergillus terreus</i>	Kubicek et Rohr, 1985
<i>Aspergillus carneus</i>	Lin, 1973
<i>Penicillium citrinum</i>	Betina, 1989
<i>Penicillium verrucosum</i>	Muller et Boley, 1992
<i>Penicillium purpurescens</i>	Frank, 1992
<i>Penicillium palhans</i>	Frank , 1992
<i>Penicillium cycloptum</i>	Frank , 1992
<i>Penicillium viridicatu</i>	Frank , 1992
<i>Penicillium steckii</i>	Jabbar et Rahim, 1962
<i>Penicillium corylophilum</i>	El – Kady coll., 1994

<i>Monascus</i>	Blanc et coll., 1995 ; Hajjaj et coll., 2000
-----------------	--

Les champignons filamenteux *Monascus* sont couramment employés pour produire des colorants rouges alimentaires et des substances à vocation thérapeutique, telles que les monacolines K, J et L à activité hypocholestérolémique. (Juzlova et coll., 1996) ; cependant, ces champignons produisent également la CTN (Blanc et coll., 1995). La production de CTN dépend de divers facteurs tels que la température, l'humidité, la nature du substrat, la durée de l'infestation, la coexistence d'autres moisissures et le type de moisissure (Comerio et coll., 1998). Cependant, la teneur en eau et la température reste les facteurs prépondérants dans la croissance et la toxinogénèse des champignons producteurs de CTN (Jackson et Ciegler ; 1978 ; Pastrana et coll., 1994 ; Comerio et coll., 1998). Ainsi pour la CTN, la température optimale de production se situe entre 26 et 30°C pour *Penicillium citrinum* (Begum et Samajpati, 2000).



Figure 5. Photo d'*Aspergillus terreus*

III. Contamination naturelle

III.1. Contamination végétale et animale

Les premiers cas de contamination naturelle ont été signalés dans le riz en 1951 au Japon (Saito et coll., 1971). La CTN est un contaminant alimentaire naturel présent essentiellement dans les céréales comme le maïs, le blé, l'orge et le riz (CAST, 2003). Plusieurs travaux ont montré que la CTN est impliquée dans les syndromes néphrotoxiques chez le porc aux Balkans (Frank, 1992 ; IARC, 1986) et au Brésil (Rosa et coll., 1985) et dans les syndromes du riz jaune

au Japon (Saito et *coll.*, 1971). Par ailleurs, la présence de CTN a été mise en évidence dans de nombreux produits d'origine animale destinés à l'alimentation humaine tels que le lait, la viande et les fromages (Wilson et *coll.*, 2002). Des cas de contamination de produits végétaux ont été constatés un peu partout dans le monde. Le tableau 5 rend compte de la présence naturelle de CTN dans les produits végétaux dans différents pays.

Tableau5. Contamination naturelle des produits végétaux par la citrinine

Pays	Echantillon	Niveau de contamination	Références
Tunisie	Blé		Blaude et <i>coll.</i> , 1992
Ghana	Maïs	548 µg/Kg	Kpodo et <i>coll.</i> , 1995
France	Formage	600 mg/Kg	Bailly et <i>coll.</i> , 2002
Argentine	Blé	65 µg/Kg	Comerio et <i>coll.</i> , 1998
Canada	Orge	38 g /Kg	Abramson et <i>coll.</i> , 1999
Inde	Maïs	12 µg/Kg	Janardhana et <i>coll.</i> , 1999
USA	Riz rouge	0,47-11,82 µg/capsule	Heber et <i>coll.</i> , 2001
Chine		0,2-140 mg/Kg	Xu et <i>coll.</i> , 1999
Taiwan, Chine		4,2-25,1 mg/Kg	Shu et Lin., 2002
Allemagne	Fourrage ensilé	2,4-64,2 µg/Kg	Schneweis et <i>coll.</i> , 2001
Egypte	Fruits	280-400 µg/Kg	Aziz et Moussa ; 2002
Portugal	Pomme	320-920 µg/Kg	Martins, 2002
Allemagne	Pain complet à base de seigle	1,1 µg/Kg	Odhav et Naicker., 2002
Allemagne	Pain complet à base de blé	0,5 µg/Kg	Meister., 2004
Allemagne	Son de blé	1,9-2 µg/Kg	Meister., 2004
Allemagne	Noix de cacao	2,4 µg/Kg	Meister., 2004
Allemagne	Riz rouge	2,9 µg/Kg	Meister., 2004

IV. Toxicocinétique de la citrinine

IV.1. Absorption, biotransformation et excrétion

Administrée à l'animal par voie orale, la CTN est absorbée par la paroi gastrique. La présence de groupements phénoliques et carboxyliques dans la molécule de la CTN lui confère des propriétés acides à caractère hydrophile faible, cela facilite son absorption à travers la double couche lipidique membranaire. Ainsi, l'absorption de la CTN se fait majoritairement par diffusion passive (Yiannikouris et Jouany, 2002), le métabolisme de la CTN se fait selon deux voies principales : l'oxydation et la conjugaison, la CTN peut ainsi être transformée en dihydrocitrinone (Dunn et coll., 1983). Les voies d'excrétion urinaires et fécales constituent les voies majeures d'élimination (Yiannikouris et Jouany, 2002).

V. Mécanismes d'action de citrinine

Les données concernant la mutagénicité et la génotoxicité de la CTN sont controversées. Certaines études ont montré que la CTN provoque des cassures simples et doubles brins dans l'ADN d'*Echerichia coli* (Martin et coll., 1986). Divers autres dommages à l'ADN induits par la CTN ont été également mis en évidence, particulièrement la fragmentation de l'ADN de cellules rénales embryonnaires humaines qui conduit à l'apoptose (Pfeiffer et coll., 1998 ; Ueno et coll., 1995 ; Hardy et coll., 2003).

De plus, la CTN provoque des aneuploïdies dans les cellules V79 d'hamster et induit la formation d'anomalies chromosomiques telles que des cassures de chromosomes et de chromatides. Elle forme également des fragments acentriques dans des cellules de moelle osseuse de souris traitées (Jeswal, 1996 ; Pfeiffer et coll., 1998). Par ailleurs, ces mêmes études montrent que la CTN inhibe la polymérisation des microtubules d'où l'arrêt mitotique et l'induction de micronoyaux (Pfeiffer et coll., 1998).

Des travaux réalisés sur des cellules V79 ont montré que la CTN ne présente pas d'effets clastogéniques, alors qu'en présence d'activation métabolique par des enzymes microsomaux, elle devient clastogène (Thust et Kneist, 1979). Cependant, des études plus récentes réalisées sur des lymphocytes humains, sur des cellules rénales embryonnaires humaines et sur des cellules ovariennes de hamster indiquent que la CTN ne présente pas d'effet génotoxiques (Liu et coll., 2003).

Concernant la mutagénicité de la CTN, plusieurs travaux existent, les résultats sont cependant contradictoires. En effet, certaines études ont montré l'absence d'effets mutagènes de la CTN (Kuczuk et *coll.*, 1978; Wuergler et *coll.*, 1991), d'autres études ont montré le contraire, en réalisant le test d'Ames sur des bactéries *salmonella thyphimurium* TA-98 exposées à la CTN métabolisée au préalable par des hépatocytes de rat (Sabater-Vilar et *coll.*, 1999). Cela laisse certains auteurs supposer que la CTN nécessite un complexe cellulaire de biotransformation pour exercer son effet mutagène (Thust et Kneist, 1979; Sabater-Vilar et *coll.*, 1999).

VI. Les principaux effets toxiques de la citrinine

VI.1. Néphrotoxicité

En raison de ses fonctions de filtration, de concentration et d'épuration, le rein peut se trouver exposé à de fortes concentrations de toxiques. De ce fait, le rein constitue un organe cible préférentiel pour les xénobiotiques particulièrement la CTN. La néphropathie constitue l'effet majeur de CTN. En effet, elle agit sur le tubule proximal du rein (Phillips et *coll.*, 1980; Kitabatake et *coll.*, 1993; Kogika et *coll.*, 1993). Des expérimentations *in vivo* ont montré que la CTN affecte l'ultra structure et le fonctionnement rénal (Krejci, 1996). De plus, elle est capable d'induire la formation d'adénomes rénaux chez des rats ayant ingéré des aliments contaminés (Arai et Hibino, 1983). La CTN, lorsqu'elle est associée à d'autres mycotoxines particulièrement l'OTA, est même suspectée d'être un agent causal de la Néphropathie Endémique des Balkans (FAO, 1982; IARC, 1986, Franc, 1992).

La Néphrotoxicité est également décrite chez des animaux tels que les oiseaux, le porc, le chien et le rat (Krogh et *coll.*, 1973; Glahn et *coll.*, 1989; Baggett et Berndt, 1984).

VI.2. Hépatotoxicité

La CTN a été largement décrite comme substance hépatotoxique (Gupta et *coll.*, 1984; IARC, 1986; Frank, 1992). En effet, elle interagit avec le système mitochondrial transporteur d'électrons dans des hépatocytes de rat (Aleo et *coll.*, 1991), induisant des radicaux libres (Ribeiro et *coll.*, 1997). Ce dysfonctionnement mitochondrial provoque au niveau hépatique une diminution du taux du glycogène et une inhibition de la synthèse du cholestérol et des triglycérides (Chagas et *coll.*, 1992).

VI.3. Cancérogénicité

Peu de travaux concernant la cancérogénicité de la CTN existent. Cependant, certains ont montré, chez le rat et chez la souris, après intoxication chronique à CTN, l'existence d'adénomes et de carcinomes rénaux (Arai et Hibino, 1983).

VI.4. Cytotoxicité

La CTN est capable d'inhiber la synthèse protéique, cette inhibition a été mise en évidence *in vitro*, sur des cellules cancéreuses du foie (HTC) (Creppy et *coll.*, 1980). Liu et *coll.* (2003) ont montré que la CI50 de la viabilité cellulaire est de 60 μ M au niveau de cellules rénales embryonnaires humaines. La CTN inhibe également la synthèse d'ADN (Chagas et *coll.*, 1992). D'autre part, la CTN est capable d'induire la formation de radicaux libres oxygénés, responsables de la peroxydation des lipides membranaires (Ribeiro et *coll.*, 1997).

VI.5. Immunotoxicité

Le système immunitaire semble très sensible à l'action de la CTN. En effet, la CTN a été trouvée immunosuppressive (CAST, 2003). Gupta et *coll.* (1989) ont montré *in vivo* que la CTN abaisse la réponse immunitaire en diminuant la production des précurseurs de cellules de la moelle osseuse, d'érythrocytes et de leucocytes. De même des études plus récentes par Wichmann et *coll.* (2002) ont montré que la CTN abolit la production d'interleukine 4 (IL4). La CTN supprime par ailleurs l'activité de cellules tueuses (Naturel killer) ainsi que la production d'interféron.

VI.6. Tératogénicité

La CTN est tératogène chez l'animal (Wen-HsiungChan, 2008). Elle provoque des anomalies morphologiques diverses chez le rat et chez l'embryon de poulet (Reddy et *coll.*, 1982 ; Mayura et *coll.*, 1984 ; Chan, 2007; Chan et Shiao, 2007). Elle provoque également un retard de croissance, microphthalmia et exencephalie des malformations fœtales, une perte de poids des fœtus et des anomalies touchant les membres (Vesela et *coll.*, 1982). Sur des cellules hépatiques de fœtus de rats, Sako et *coll.* (1983) ont montré que la CTN a un effet comparable à celui de l'acide laccaïque qui est un agent mutagène.

D. Généralité sur l'aflatoxine B1 : Mycotoxine Hepatocancerigene

I- Structure et propriétés physico-chimiques

À la suite d'une maladie « Turkey X disease » qui a affecté la volaille en Angleterre, et plus particulièrement les dindons, Sargeant *et coll.*, (1961) ont isolé de la nourriture de ces volailles à base d'arachide, une substance capable d'induire expérimentalement la même maladie. Ce fut le début d'une série de recherches qui aboutit en 1965 à l'isolement et à la caractérisation de la structure des aflatoxines (Asao *et coll.*, 1963). Une des plus célèbres mycotoxines possédant le profil toxicologique le plus sérieux, est l'aflatoxine B1 (AFB1) dont le nom chimique est le suivant: **6-Méthoxydifurocoumarone2,3,6 α , 9 α -tétrahydro-4-méthoxy-cyclopenta-[c]furo[3',2':4,5]furo [2,3-h][l]benzopyran-1,11-dione.**

L'Aflatoxine B1 (AFB1) est la mycotoxine la plus étudiée parmi le groupe des Aflatoxines (AF). Les AF constituent un assemblage d'une coumarine et de trois furanes. Elles sont classées en deux groupes selon leur structure chimique ; les difurocoumarocyclopentone (AFB1, AFB2, AFB2a, AFM1, AFM2, AFM2a, aflatoxicol) et les difurocoumarolactone (AFG1, AFG2, AFG2a, AFGM1, AFGM2, AFGM2a, AFB3) (Mclean et Dutton, 1995). Les structures de ces AF sont illustrées dans la Figure 6.

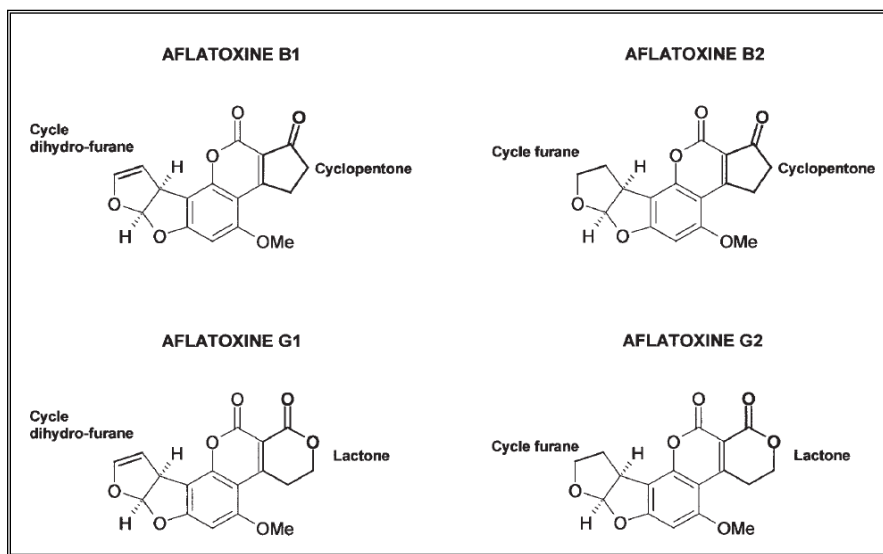


Figure 6 : Structures des Aflatoxines B1, B2, G1 et G2

Les AF sont des molécules cristallines, de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires (Tableau 6). Très solubles

dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme, DMSO et alcool méthylique), elles sont assez facilement extraites. Sous lumière ultra-violette, elles émettent une fluorescence bleue pour les AFB "blue" et verte pour les AFG "green", l'AFM1 ayant une fluorescence bleu-mauve (McClean et Dutton, 1995).

Tableau 6. Propriétés physicochimiques des Aflatoxines B1, B2, G1, G2, M1 et M2

Aflatoxines		PM	T°fusion	Max Abs UV 265	Max Abs UV 360-362
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268	12,400	21,800
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286	12,100	24,000
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244	9,600	17,700
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237	8,200	17,100
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14,150	21,250 (357)
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	12,100 (264)	22,900 (357)

Les cristaux d'AF sont extrêmement stables en absence de lumière et plus particulièrement les radiations UV, même à des températures supérieures à 100°C. Les AF sont résistantes à la dégradation thermique et ne sont donc pas complètement détruites par l'eau bouillante, par un autoclavage ou par de nombreux procédés thermiques de transformation des aliments. A titre d'exemple, plus de 50 % des teneurs en AF sont retrouvées dans les aliments après cuisson du riz ou des pâtes (Lopez-Garcia et *coll.*, 1999). De même, l'AFB1 résiste au chauffage des huiles (Peers et *coll.*, 1975) alors que l'AFM1 résiste à la pasteurisation (Pons et *coll.*, 1972).

Toutefois, les AF peuvent être dégradées en milieu très acide ou très alcalin, mais le délai nécessaire à cette dégradation rend inapplicable l'utilisation directe des acides ou des bases sur les aliments (Wiseman et *coll.*, 1983).

II. Mycologie et toxinogénèse de l'aflatoxine B1

Les AF ont été identifiées pour la première fois en 1960 comme les toxines responsables de la mort de plus de 100.000 dindes en Angleterre (Sargeant et *coll.*, 1961). Trois souches d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser les AF. Il y a *A.flavus* qui produit

principalement l'AFB1 et l'AFB2. *A. parasiticus*, produit les 4 AF (B1, B2, G1, G2) (Asao, 1963 ; Cullen et Newberne, 1994). Les conditions favorables à la toxinogénèse peuvent être différentes des conditions optimales d'infestation ou de croissance des moisissures et elles diffèrent selon le végétal contaminé et l'*Aspergillus* en cause (Cotty et coll., 1989a,b). D'une manière générale, les conditions de température sont déterminantes pour la production d'AF. En effet, une toxinogénèse optimale est obtenue pour des températures voisines de 30°C dans le sol, aucune synthèse d'AF n'étant observée en dessous de 25°C et en dessus de 32°C (Cole et coll., 1989).

III. Contamination naturelle

III.1. Contamination végétale et animale

Les AF sont généralement trouvées dans des nourritures en provenance de régions chaudes et humides; il s'agit de contaminants alimentaires naturels présents dans des produits à base de noix comestibles et de leurs dérivés (arachides, noix du Brésil, pistaches, amandes, noix, noix de pecan, noisettes), de graines d'oléagineux (coton, copra) et des produits qui en sont dérivés, de grains (maïs, sorgho, millet) et de figes (Binder et coll., 2007).

La contamination humaine par les AF peut s'effectuer soit directement par la consommation de denrées contaminées (arachides, pistaches, amandes...), soit indirectement par des produits dérivés (farine de céréales) à partir desquels sont élaborés des aliments finis. Mais les AF peuvent aussi se transmettre par des produits d'origine animale (lait et produits laitiers, abats, charcuterie...). Dans le monde, l'exposition aux AF varie largement en fonction du régime alimentaire (Tableau 7).

Tableau 7. Contamination humaine par l'AFB1 dans certains pays

Pays	Echantillon	Incidence %	Teneur ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	Références
Pakistan	Piments	54	32.11–93	Russell et Paterson, 2007
Iran	Pistache	36,7	5	Cheraghali et coll., 2007
Maroc	Epices	100	2.88 – 5.4	Zinedine et coll., 2006

Bangladesh	Maïs	67	33.0	Dawlatana et <i>coll.</i> , 2002
Brésil	Maïs	38.3	0.2–129.0	Vargas et <i>coll.</i> , 2001
Brésil	Sorgho	12.8	7.0–33.0	Da Silva et <i>coll.</i> , 2000
Chine	Maïs	76	>20.0	Li et <i>coll.</i> , 2001
Egypte	Epices	40	>0.250	Selim et <i>coll.</i> , 1996
Corée	Maïs	19	74.0	Park et <i>coll.</i> , 2002
Tunisie	Maïs	42,8	2,9 – 12,5	Ghali et <i>coll.</i> , 2007

IV. Toxicocinétique de l'aflatoxine B1

La phase toxicocinétique englobe l'absorption du toxique dans l'organisme et tous les processus ultérieurs : transport par les fluides de l'organisme, distribution et accumulation dans les tissus et les organes, biotransformation en métabolites et excrétion du toxique ou de ses métabolites.

IV.1 Absorption de l'Aflatoxine B1

L'AFB1 est une petite molécule lipophile. Des études menées chez le rat ont montré que l'absorption par voie orale ou trachéale est suivie d'une diffusion passive au niveau du duodénum et qu'elle est importante puisque plus de 70% des doses administrées par voie orale ont pu être détectées après élimination dans les urines et les fèces (Coulombe et *coll.*, 1985 ; Hsieh et Wong, 1994). Après son absorption, la forme circulante de l'AFB1 est majoritairement liée à l'albumine par la formation d'une base de Schiff entre un résidu lysine et le métabolite AFB1 8,9 dihydrodiol. Cette forme liée à l'albumine sert de biotraceur des contaminations par les AF.

Le volume de distribution de l'AFB1 est relativement faible et se limite aux organes impliqués dans le métabolisme et l'épuration des toxiques, essentiellement le foie et les reins (Galtier et *coll.*, 1998). La distribution à partir du plasma dans les hépatocytes se ferait par diffusion passive transmembranaire (Muller et *coll.*, 1988). Une fois dans l'hépatocyte, la mycotoxine atteint tous les compartiments cellulaires. 12h après l'administration de 70 pg/kg par voie intrapéritoniale de [³H]-AFB 1 à des rats, la teneur en radioactivité totale des différentes fractions cellulaires respecte l'ordre suivant : microsomes/ cytosol/mitochondries/ noyaux (Peers

er *coll.*, 1975).

IV.2 Biotransformation de l'Aflatoxine B1

La phase I de la métabolisation de AFB1 correspond au processus de bioactivation par oxydation *via* des monooxygénases à Cytochrome P450. Elle est principalement réalisée dans le foie mais la muqueuse gastro-intestinale possède aussi les enzymes capables de bioactiver l'AFB1 (Hsieh et Wong, 1994). Les principaux métabolites de phase I sont l'époxyde, les dérivés hydroxylés AFM1 et AFQ1 et l'Aflatoxicol. Ce dernier est un métabolite issu de la réduction réversible de la fonction cétone en C1 de AFB1 *via* une réductase NADPH dépendante cytosolique (Eaton et *coll.*, 1994 ; Galtier, 2003). La O-déméthylation de l'AFB1 conduit à l'Aflatoxine P1 (AFP1) qui est ensuite détoxiquée par une UDP-glucuronyl-transférase.

D'après une étude menée *in vitro* sur la fraction microsomale d'hépatocytes humains, il existerait un rôle prépondérant de l'isoforme CYP1A2 dans les réactions d'oxydation de l'AFB1 en AFM1 (4-hydroxy AFB1) et AFB1 8,9-époxyde. Le CYP3A4 a une affinité plus modeste, il présente deux sites de liaison pour AFB1 et se trouve impliqué dans la formation de l'AFQ1 (3 α -hydroxy AFB1, peu toxique) et, dans une moindre mesure, dans celle de l'AFB1 8,9-époxyde (Gallagher et *coll.*, 1996 ; Guengerich et *coll.*, 1996).

Les métabolites de phase II les plus abondants sont les dérivés de l'époxyde conjugués au GSH et les dérivés glucurono ou sulfoconjugués de AFM1, AFQ1, et AFP1. Cette deuxième phase correspond surtout à la détoxification de l'AFB1 8,9-époxyde. Elle est principalement assurée par une réaction de glutathion conjugaison réalisée par des glutathion S-transférases (GST) sur la fonction époxyde.

IV.3. Excrétion de l'Aflatoxine B1

Après transformation, l'AFB1 est principalement éliminée par clairance hépatique (Dalezios et *coll.*, 1972), ceci constituant une première explication de la fréquence des lésions hépatiques lors d'aflatoxicoses. L'élimination hépatique de la mycotoxine est surtout réalisée par biotransformation, très peu d'AFB1 non métabolisée étant présente dans la bile (Wong et *coll.*, 1980).

L'excrétion des AF est lente. Chez le rat, la souris ou le singe, seulement 70 à 80% d'une dose non toxique d'AFB1 administrée par voie intraveineuse est éliminée en 4j, la plus grande

partie étant toutefois excrétée dans les 24h (Wong et *coll.*, 1980). Dans la plupart des espèces animales, la sécrétion biliaire des AF est prépondérante représentant environ 50 % de la dose excrétée. Les principaux métabolites retrouvés sont des conjugués au GSH et accessoirement des glucurono ou sulfoconjugués (Holeski et *coll.*, 1987 ; Monroe et Eaton, 1988).

L'excrétion urinaire est également une voie importante d'élimination des AF, représentant approximativement 15 à 25 % de la dose excrétée. L'AFM1 est le métabolite prépondérant dans la plupart des espèces (Helferich et *coll.*, 1986). D'autres métabolites tels que l'AFB1-N7Guanine, produit de dégradation de certains adduits d'ADN (Ming et Wen, 1997), des dérivés des conjugués au GSH (Allameh et *coll.*, 2000), de l'AFQ1 et d'autres métabolites plus rares ont été identifiés.

Enfin, l'excrétion d'AF dans les oeufs et dans le lait des animaux exposés a été également souvent rapportée. En effet, l'AFM1 demeure une molécule toxique et se trouve excrétée dans les urines mais aussi dans le lait (Guerre et *coll.*, 1996 ; Gurtoo et *coll.*, 1978). Le risque existe alors pour l'homme consommateur de lait de vache ou de ses dérivés, mais aussi pour les jeunes animaux allaités qui peuvent eux aussi être destinés à l'alimentation humaine. L'AFM1 pose donc un problème de santé publique car c'est une substance toxique classée dans le groupe 2B par l'IARC, c'est-à-dire un cancérigène potentiel (IARC, 1993).

V. Mécanismes d'action de l'Aflatoxine B1

V. 1. Génotoxicité

Les AF provoquent différentes lésions de l'ADN : aberrations chromosomiques, formation de micronoyaux, échange de chromatides soeurs, synthèse non programmée d'ADN (Wang et Groopman, 1999). Ces effets sont principalement liés à l'action toxique des époxydes formés par l'action du système des monooxygénases à Cytochromes P450 (Leanne et *coll.*, 2006). C'est la fonction exoépoxyde qui est le site hautement réactionnel de l'AFB1 8,9-époxyde conduisant à la formation d'adduits à l'ADN en position N7 de la guanine (Eaton et *coll.*, 1994).

L'AFB1 8,9-époxyde peut aussi se lier à des protéines (protéines nucléaires, liaison aux histones H3) et en modifier la structure et les fonctions (Kensler et *coll.*, 2003 ; Mclean et Dutton, 1995). La liaison de l'AFB1 8,9-époxyde aux protéines portant une séquence de translocation nucléaire aggraverait les effets toxiques de la molécule en facilitant le transport à

proximité de l'ADN. La liaison aux protéines cytosoliques, non transloquées vers le noyau ou les mitochondries, formerait un stock d'AFB1 potentiellement toxique (Ch'ih et *coll.*, 1993).

Les travaux portant sur les effets génotoxiques et carcinogènes des AF discutent surtout de l'importance de l'AFB1 8,9-époxyde mais il est important de préciser que les formes époxydes des AFG1 et AFM1 et de l'Aflatoxicol conduisent aussi à la formation d'adduit à l'ADN (Marien et *coll.*, 1987).

V.2. Cytotoxicité

Sur le plan moléculaire, l'AFB1 inhibe la synthèse d'ADN, l'activité ARN polymérase-ADN dépendante, la synthèse d'ARN messenger ainsi que celle des protéines (BuMcLean et Dutton, 1995). Une étude réalisée par Bonsi et *coll.* (1999) a démontré que l'AFB1 peut inhiber l'activité nucléotide phosphodiesterase cyclique dans le cerveau, le foie, le cœur et les tissus rénaux. Plus récemment, l'AFB1 a été trouvée capable d'induire les protéines de choc thermique Hsp70 marqueurs de cytotoxicité (Meki et *coll.*, 2004).

L'apoptose est aussi l'un des mécanisme cytotoxique induit par l'AFB1 (O'Brien et *coll.*, 2000). En effet, il a été montré que l'AFB1 est capable d'activer la p53, cette activation a été suivie d'une fragmentation de l'ADN en faveur d'un processus apoptotique. Les travaux de Meki et *coll.*, (2004) montrent que l'AFB1 est aussi capable d'activer la caspase-3.

VI. Les principaux effets toxiques de l'Aflatoxine B1

VI.1. Cancérogène de l'Aflatoxine B1

Les AF sont des agents potentiellement cancérogènes pour l'homme. En effet, l'action cancerogène de l'AB1 est reconnue par IARC qui la classe dans le groupe 1 : effet cancérogène certain pour l'homme (IARC, 1993). L'interaction ADN-AF et la formation d'adduit à l'ADN est le point clef dans le développement du processus de cancérogène. Ceci a été clairement démontré, lors d'études expérimentales chez l'animal (Bailey, 1994).

L'exposition chronique aux AF est responsable de cancers dans diverses espèces animales. En effet, l'AFB1 mais également le mélange des quatre AF (B₁, B₂, G₁, G₂) induit des tumeurs hépatiques aussi bien chez la souris que le rat, mais également chez le canard, la truite, le saumon et le singe (Wogan, 1976, 1992, 2000). En général, il s'agit de cancer primaire du foie caractérisé par des carcinomes hépatocellulaires et des hépatoblastomes (Dominguez-Malagon et

Gaytan-Graham, 2001; Wang et *coll.*, 2001), De plus, l'inhalation de poussière contenant des AF a été responsable de tumeurs du système respiratoire (Kelly et *coll.*, 1997).

Chez l'homme, des études conduites sur des populations chinoises ont permis de mettre en évidence une mutation du gène suppresseur de tumeur p53 (codon 249) dans un cas sur deux de carcinome hépatocellulaire associé à une exposition aux AF. Cette mutation est une délétion qui modifie le cadre de lecture de ce gène suppresseur de tumeur, l'inactive et augmente la possibilité d'activation d'oncogènes (Aguilar et *coll.*, 1993). D'autres études épidémiologiques menées en Afrique ont aussi établi que le risque de cancer hépatique est associé au cumul des expositions aux AF (Wild et *coll.*, 2000 ; Williams et *coll.*, 2004).

VI.2. Hépatotoxicité

En raison de ses capacités de bioactivation, le foie est la cible principale des AF. La principale conséquence d'une intoxication grave par les AF est la nécrose hépatique qui se traduit par une forte augmentation des transaminases plasmatiques. Cette nécrose est associée à une infiltration de cellules inflammatoires (Meissonnier et *coll.*, 2005). La réduction du nombre d'hépatocytes et leur dysfonctionnement provoque une stéatose et une choléstase avec l'augmentation des taux plasmatiques en bilirubine, phosphatases alcalines et γ - glutamyl transférase accompagnés d'une prolifération des canalicules biliaires et le développement d'une fibrose hépatique (Wang et Groopman, 1999).

VI.3. Immunotoxicité

Chez l'animal, l'AFB1 exerce des propriétés immunosuppressives affectant en particulier l'immunité à médiation cellulaire par inhibition de la phagocytose, diminution de la production de radicaux oxygénés et altération de la production de cytokines (Dugyala et Sharma, 1996; Liu et *coll.*, 2002). Son effet sur l'immunité à médiation humorale s'observe pour des expositions plus élevées, variables d'une espèce animale à une autre (Bondy et Pestka, 2000 ; Oswald et *coll.*, 2003). Les effets immunosuppresseurs de l'AFB1 semblent dus à l'altération de la synthèse d'acides nucléiques et de protéines avec diminution de la prolifération, de la maturation cellulaire et de la production des cytokines (Hatori et *coll.*, 1991 ; Moon et *coll.* 1999a,b). La réactivation d'infections parasitaires et la diminution de l'efficacité vaccinale ont été mises en évidence expérimentalement sur plusieurs modèles animaux après administration d'AFB1 (lapin, souris, porc) (Venturini et *coll.*, 1996 ; Neal, 1998).

Chez différentes espèces de poissons, une exposition à l'AFB1 entraîne une réduction de la capacité de phagocytose des macrophages, ou la suppression de l'activité bactéricide du sérum, de la fonction neutrophile, de la réponse humorale immune ou encore une suppression de la production d'immunoglobulines et de la prolifération des lymphocytes (Sahoo et Mukherjee, 2001).

E. Les toxicités de combinaisons de mycotoxines

I. Contamination naturelle de mélange de moisissures

La prolifération des champignons n'est pas assez exigeante en terme de conditions climatiques (température, humidité, oxygène...). Ainsi, plusieurs espèces de moisissures peuvent croître en même temps (Figure 7); de plus, une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines (*Fusarium* peut produire du désoxynivalénol et du nivalénol, *Penicillium* et *Aspergillus* productrices d'ochratoxine A produisent également d'autres toxines néphrotoxiques) (Yiannikouris et Jouany, 2002 ; Creppy et coll., 1995). (Tableau 8).

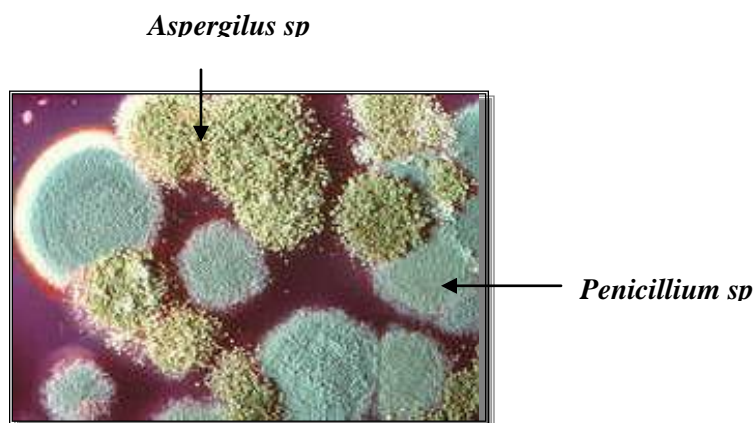


Figure 7 : Cohabitation d'*Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.*

Tableau 8. Souches de moisissures productrices d'ochratoxine A qui synthétisent d'autres toxines (Creppy et coll., 1995)

Moisissures et coproduction	Toxines co-produites
<i>P.commune</i>	Citrinine

<i>P.commune</i>	Acide penicillique
<i>P.aurantiogriseum</i> , <i>P.viridicatum</i>	Citrinine, acide penicillique, viomelléine
<i>A. sulphureus</i>	Acide penicillique
<i>A.ochraceus</i>	Acide penicillique, viomelléine
<i>A.petrakii</i>	Acide penicillique
Moisissures et cohabitation	
<i>A.ochraceus</i> et <i>A.flavus</i>	Aflatoxines, ochratoxine A
<i>A.ochraceus</i> et divers <i>Penicillium</i>	Aflatoxines, ochratoxine A Citrinine, patuline, acide cyclopiazonique, acide penicillique, acide kojique,

De nombreuses études ont démontré que plusieurs mycotoxines peuvent coexister dans un même aliment (Hagler *et coll.*, 1984). Abbas *et coll.* (1989) ont démontré que des espèces de *Fusarium* isolées dans du maïs au Minnesota produisent de multiples mycotoxines. Ainsi, le mélange de mycotoxines dans l'alimentation animale ou humaine peuvent par conséquent, induire de nombreuses interactions entre elles.

Des contaminations multiples par des espèces de *fusarium* sont souvent mises en évidence dans les aliments et surtout dans les céréales (Doko *et coll.*, 1996). L'exemple du triticales est le plus connu. Cette variété de triticales ne résiste pas à la fusariose des épis, maladie des céréales qui peut provoquer des pertes de rendement pouvant atteindre 20% lorsque le climat est favorable. Les effets sont pernicieux et consistent en accumulation de mycotoxines dans les grains. Les toxines les plus fréquentes sont les trichothécènes (surtout la déoxynévaléol) et la zéaralénone (Arseniuk *et coll.*, 1999).

Schaeffer et Hamilton. (1991) ont montré que les aliments contaminés naturellement sont plus toxiques que les aliments auxquels la même concentration d'une mycotoxine pure est rajoutée. Une explication généralement acceptée de ce phénomène est la présence possible de plus d'une mycotoxine dans un aliment moisi naturellement.

De même, des études ont montré qu'une contamination naturelle par l'aflatoxine dans une culture est plus toxique pour les bovins laitiers que l'aflatoxine pure ajoutée à leur alimentation (Applebaum *et coll.*, 1982). Chez les porcs, Foster *et coll.* (1986) ont démontré des aliments auxquels ils ont ajouté la DON pure étaient moins toxiques que des aliments contenant des concentrations similaires de DON, provenant de denrées contaminées naturellement. Smith

et MacDonald (1991) ont émis l'hypothèse que l'acide fusarique produit par plusieurs espèces de *Fusarium* s'associe à la DON pour produire des symptômes plus graves.

Lillehoj et Ceigler (1975) ont donné un exemple où l'acide pénicillique et la citrinine étaient inoffensifs chez des animaux de laboratoire lorsqu'ils étaient administrés séparément, mais mortels à 100 % lorsqu'ils étaient administrés conjointement.

Le tableau 9 résume les principales combinaisons qui se manifestent naturellement.

Tableau 9. Les différentes combinaisons naturelles de mycotoxines

Mycotoxines	Références
Ochratoxine A et citrinine	Vrabcheva et <i>coll.</i> , 2000 Bragulat et <i>coll.</i> , 2008
Ochratoxine A et zéaralenone	Halabi et <i>coll.</i> , 1998
Ochratoxine A et l'acide pénicillique	Stoev et <i>coll.</i> , 2001
Ochratoxine A, aflatoxine B1 et citrinine	Nguyen et <i>coll.</i> , 2007
Ochratoxine A et aflatoxine B1	Sedmikova et <i>coll.</i> , 2001 Villa et Markakil, 2008
Patulin et citrinine	Martins et <i>coll.</i> , 2002
Fumonisine B1 et moniliformine	Gutema et <i>coll.</i> , 2000
Aflatoxine B1, fumonisine B1, zéaralenone, deoxynivalenol, nivalenol	Eskola et <i>coll.</i> , 2001
Deoxynivalenol, nivalenol, déacétoxyscirpenol, T2, HT2 toxines	Pronk et <i>coll.</i> , 2002

II. Les combinaisons de mycotoxines et effets produits

L'exposition à de multiples mycotoxines peut mener à une synergie, une potentialisation, une coalition, etc... Le tableau 10 résume les principales interactions de mycotoxines combinées. En effet, l'acide fusarique accroît la toxicité des fumonisines chez le poulet (D'Mello et McDonald, 1997) et celle du déacétoxyscirpenol (DAS) et de la DON chez le porc (Smith *et*

coll., 1997). L'association de la ZEN et de l'acide fusarique augmente de 2 à 5 fois leurs concentrations dans le lait chez le rat (Porter *et coll.*, 1998).

Une interaction entre la FB1 et la DON induit un accroissement de la quantité de protéines dans le sang, alors que celle impliquant la FB1 et la T-2 toxine conduit à une augmentation du taux du calcium du sérum de poulet (Kubena *et coll.*, 1997a) et du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite chez la dinde (Kubena *et coll.*, 1995).

La réduction de la masse corporelle chez des poulets est de 18 à 20 % lors de l'administration d'une ration contaminée par 300 mg de FB1 durant 20 jours après la naissance ; de 18 % pour 5 mg de T-2 toxine par kg de ration ; de 2 % pour 15 mg de DON par kg de ration; de 32 % lors d'une association FB1 et T-2 toxine; de 19 % lors d'une combinaison FB1 et DON (Kubena *et coll.*, 1997a). Chez la dinde, dans les mêmes conditions, 300 mg de FB1 par kg de ration réduisent de 24 à 30 % le gain de poids; la DAS à 4 mg par kg de ration réduit ce gain du poids de 30 %; d'OTA à 3 mg par kg de ration le réduit de 8 %; une association de FB1/DAS ou de FB1/OTA réduisent ce gain du poids respectivement de 46 et de 37 % (Kubena *et coll.*, 1997b).

D'autres combinaisons entre DON et DAS, entre DAS et aflatoxines et entre aflatoxines et FB1 ont également des effets synergiques (Harvey *et coll.*, 1995).

Les interactions de plusieurs mycotoxines sont dépendantes à la fois de l'activité de chacune des mycotoxines vis-à-vis du micro-organisme cible et des proportions de leur mélange. À faible dose un mélange de desoxynivalenol, de zéaralénone et de fumosine B1 montre un comportement antagoniste vis-à-vis d'une culture de *Saccharomyces* (levure) alors que celui-ci devient synergique à forte dose (Boeira *et coll.*, 2000).

En ce qui concerne notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets combinés de l'OTA / CTN et OTA / FB1

Tableau 10. Les principales interactions décrites de combinaisons de mycotoxines

Mycotoxines	Fonction étudiée	Effets	Références
Ochratoxine A et fumonisine B1	<i>In vitro</i> : Cytotoxicité	Synergique	Creppy <i>et coll.</i> , 2004
Ochratoxine A et fumonisine B1	<i>In vivo</i> : Poids corporel	Additif	Kubena <i>et coll.</i> , 1997b
Ochratoxine A et acide penicillique	Létalité cytotoxicité Hématotoxicité	Synergique	Stoev <i>et coll.</i> , 2000

	immunotoxicité		
Ochratoxine A et aflatoxines B1	Létalité Hépatotoxicité néphrotoxicité	Synergique	Sedmikova et <i>coll.</i> , 2001
Ochratoxine A et T-2 toxines	Poids corporel Téatogénicité Immunotoxicité	Synergique	Muller et <i>coll.</i> , 1999
Zéaralénone, deoxynivalénol, nivalénol, toxines T-2, fumonisine B1	<i>In vitro</i> : cytotoxicité	Additif	Tajima et <i>coll.</i> , 2002
Deoxynivalénol et nivalénol	<i>In vitro</i> : cytotoxicité	Synergique	Tajima et <i>coll.</i> , 2002
Nivalénol et T2 toxines	<i>In vitro</i> : cytotoxicité	Synergique	Tajima et <i>coll.</i> , 2002

III. La combinaison ochratoxine A et citrinine : Mycotoxines Néphrotoxiques

III.1. Conditions naturelles de contamination

L'ochratoxine A et la citrinine sont deux mycotoxines qui contaminent les céréales lors du stockage. Elles peuvent être formées en même temps par les mêmes moisissures *Aspergillus* ou *Penicillium* (Tableau 11) (Abarca et *coll.*, 1997 ; Mantle et McHugh, 1993 ; Wolff, 2000 ; Molinié et *coll.*, 2005).

Tableau 11. Principales moisissures productrices en même temps de l'ochratoxines A et de la Citrinine

<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Penicillium griseofulvum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
	<i>Penicillium expansum</i>

La présence simultanée des deux mycotoxines est fréquente dans les céréales (Molinié et *coll.*, 2005). Cette association a été décrite dans les pays des Balkans comme agent aggravant de la Néphropathie Endémique des Balkans (Franc, 1992 ; Vrabcheva et *coll.*, 2000).

III.2. La combinaison de l'ochratoxine A et de la citrinine

Plusieurs travaux ont étudié les interactions entre OTA et CTN. Le tableau 12 résume les principales interactions de l'OTA avec la CTN et les effets qui en découlent.

Tableau 12. Effets de l'association entre l'ochratoxine A et la citrinine

Système à teste	Fonction étudiée	Effet	Références
Cellules hépatiques	Synthèse de macromolécules ADN /ARN, protéines	Synergique	Creppy et <i>coll.</i> , 1980
Cellules rénales	Ions impliqués dans le transport	Additif	Berndt et Hayes, 1979
Rat	Ions impliqués dans le transport	Synergique	Siray et <i>coll.</i> , 1981
Chien	Néphropathie	Synergique	Kitchen et <i>coll.</i> , 1977
Poulet	Fonction rénale	Antagoniste	Glahn et <i>coll.</i> , 1988
Poulet	Ultrastructure rénale	Additif	Brown et <i>coll.</i> , 1986
Souris	Cancer de rein	Synergique	Kanisawa, 1984
Poulet	Malformation fœtale	Additif	Vesela et <i>coll.</i> , 1983
Rat	Malformation fœtale	Synergique	Mayura et <i>coll.</i> , 1984
Souris	Létalité	Synergique	Sansing et <i>coll.</i> , 1976
Porc	Létalité	Synergique	Thacker et <i>coll.</i> , 1972

IV. La combinaison ochratoxine A et aflatoxineB1 : Mycotoxines cancerigènes

IV.1. Conditions naturelles de contamination

L'AB1 et l'OTA sont deux mycotoxines qui contaminent les céréales lors du stockage (Kurtzman et *coll.*, 1987), par conséquent leur présence simultanée est fréquente dans les céréales (Molinié et *coll.*, 2005 ; Villa et Markaki, 2008).

IV.2. La combinaison de l'ochratoxine A et de la citrinine

Certains travaux ont étudié les interactions entre AFB1 et OTA. Le tableau 13 résume les principales interactions et les effets qui en découlent.

Tableau 13. Effets de l'association entre l'Aflatoxine B1 et l'Ochratoxine A

Système à tester	Fonction étudiée	Effet	Références
Lapin	Tératogenicité	Antagonisme	Wangikar et <i>coll.</i> , 2005
Poulet	Cytotoxicité	Synergie	Huff et <i>coll.</i> , 1981
<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutagénicité	Synergie	Sedmikova et <i>coll.</i> , 2001
Porcelet	Hepatotoxicité Nephrotoxicité	Absence d'interaction	Tapia, 1985