

LISTE DES ABREVIATIONS

ATA	: aleucie toxique alimentaire
Aw	: teneur en eau
AOAC	: association of official analytical chemist
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messager
ATP	: acide adénosine triphosphorique
BEN	: néphropathie endémique des Balkans
CACO2	: cellule intestinale humaine
CHU	: centre hospitalier et universitaire
CCM	: chromatographie sur couche mince
CNRA	: centre national de recherche agronomique
CPDA	: comité permanent des denrées alimentaires
CSHA	: comité scientifique de l'alimentation humaine
CyP450	: cytochrome P450
DA	: dalton
DJT	: dose journalière tolérable
DNA ou ADN	: acide désoxyribonucléique
DHTP	: dose tolérable hebdomadaire
DL50	: dose létale 50
DVS	: dose virtuellement sûre
EFSA	: autorité européenne de sécurité des aliments
ELISA	: méthode immuno-enzyatique
FAO	: organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
HPLC	: chromatographie liquide haute performance
IL2	: interleukine 2

IARC	: International Agency for research on Cancer
JECFA	: comité conjoint OMS/FAO d'experts sur les additifs alimentaires
kGy	: kilogramme gray
LDH	: lactate déshydrogénase
LCR	: liquide céphalo-rachidien
NADPH	: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
nm	: nanomètre
PM	: poids moléculaire
OT_a	: ochratoxine α
OMC	: organisation mondiale du commerce
OMS	: organisation mondiale de la santé
PGHS	: prostaglandine H synthétase
PEPCK	: phosphoénolpyruvate carboxykinase
PAL	: phosphatase alcaline
PAC	: phosphatase acide
PC	: poids corporel
RIA	: dosage radio-immunologique
SOD	: superoxyde dismutase
URSS	: Union des Républiques Soviétiques Socialistes
UE	: Union Européenne
Ur	: ultra violet
U/I	: unité internationale
μg/kg	: microgramme par kilogramme
γGT	: gamma glutamyl transpeptidase

INDEX DES FIGURES

<u>Figure 1</u>	: Structure de l'OTA et de ses composants	5
<u>Figure 2</u>	: Les dérivés de l'ochratoxine A	7
<u>Figure 3</u>	: Analogues naturels de l'ochratoxine A	8
<u>Figure 4</u>	: Distribution théorique de l'OTA entre le suc gastrique et le plasma	14
<u>Figure 5</u>	: Dérivés hydroxylés de l'OTA produits par les cytochromes –P450 et la phénylalaline hydroxylase	18
<u>Figure 6</u>	: Mode d'action de l'OTA sur la synthèse des protéines	27
<u>Figure 7</u>	: Formation de dérivés radicalaires de l'oxygène et effets toxiques au niveau cellulaire	29
<u>Figure 8</u>	: Gingembre	64
<u>Figure 9</u>	: Piment	67
<u>Figure 10</u>	: Poivre	70
<u>Figure 11</u>	: Production mondiale annuelle des épices	71
<u>Figure 12</u>	: Echantillon de piment	78
<u>Figure 13</u>	: Poivre	79
<u>Figure 14</u>	: Pastilles de gingembre	79
<u>Figure 15</u>	: Chromatogramme de l'étalon d'OTA	85
<u>Figure 16</u>	: Chromatogramme d'un échantillon contaminé	85
<u>Figure 17</u>	: Linéarité de la solution d'OTA	86
<u>Figure 18</u>	: Représentation des moyennes des concentrations en OTA des trois produits	91

INDEX DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u>	: Les différentes espèces d'aspergillus et de penicillium productrices d'OTA	9
<u>Tableau II</u>	: Demi-vie plasmatique de l'OTA, après administration orale D'une dose unique.....	15
<u>Tableau III</u>	: DL50 de l'OTA chez différentes espèces animales.....	21
<u>Tableau IV</u>	: Résultats d'études toxicologiques subaiguës chez certaines espèces	23
<u>Tableau V</u>	: Teneur en OTA dans le sang et le lait chez l'homme.....	40
<u>Tableau VI</u>	: Teneur en OTA dans le sang à Abidjan.....	43
<u>Tableau VII</u>	: Méthodes de lutte contre la contamination.....	57
<u>Tableau VIII</u>	: Distribution naturelle de l'ochratoxine A dans les produits d'origine végétale	59
<u>Tableau IX</u>	: Distribution de l'ochratoxine A dans les produits d'origine animale	60
<u>Tableau X</u>	: Résultats de l'analyse préliminaire de l'ochratoxine A dans les aliments en Côte d'Ivoire.....	61
<u>Tableau XI</u>	: Teneurs maximales (en µg/kg) en OTA dans les épices	73
<u>Tableau XII</u>	: Solutions d'étalonnage	83
<u>Tableau XIII</u>	: Les paramètres de validation de l'OTA.....	87
<u>Tableau XIV</u>	: Teneur en OTA dans les différents échantillons de gingembre	88
<u>Tableau XV</u>	: Concentration moyenne en µg/kg d'OTA dans le gingembre	88
<u>Tableau XVI</u>	: Teneur en OTA dans les différents échantillons de piment	89
<u>Tableau XVII</u>	: Concentration moyenne en µg/kg d'OTA dans le piment....	90

Tableau XVIII : Nombre d'échantillons en fonction des normes internationales	92
---	----

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES SUR L'OTA ET LES EPICES	
Chapitre 1 : Ochratoxine A	4
1. Découverte et origine de l'OTA	4
2. Structure et propriétés physico-chimiques	4
2.1. Structure	4
2.2. Propriétés physico-chimiques	5
Chapitre 2 : Production et biosynthèse de l'OTA.....	9
2.1. Conditions naturelles de production de l'OTA	9
2.2. Production de l'OTA en laboratoire.....	10
2.2.1. Culture en milieu acide	10
2.2.1.1. La température	10
2.2.1.2. Le pH et le temps d'incubation	11
2.2.1.3. Oxygénéation et substrat.....	11
2.2.2. Culture en milieu solide	11
2.3. Biosynthèse de l'OTA	12
Chapitre 3 : Devenir et toxicité de l'OTA.....	13
3.1. Absorption	13
3.2. Distribution	14
3.3. Métabolisme	16
3.3.1. Métabolisme de la partie phénylalanine.....	16
3.3.2. Métabolisme de la partie isocoumarinique	17
3.3.3. Métabolisme de l'OTA par conjugaison au glutathion	19
3.3.4. Autres voies de métabolisation	19
3.4. Excrétion de l'OTA et de ses métabolites	19
3.5. Etude toxicologique chez l'animal.....	20
3.5.1. Toxicité aigüe	20

3.5.2. Toxicité subaigue ou subchronique.....	22
3.5.3. Toxicité chronique	23
Chapitre 4. Mécanisme d'action de l'OTA.....	26
4.1. Mode d'action au niveau de la transcription et de la traduction	26
4.2. Mode d'action au niveau du métabolisme glucidique	27
4.3. Perturbations oxydatives	28
4.4. Mode d'action au niveau de la respiration mitochondriale.....	30
4.5. Mode d'action au niveau du métabolisme calcique	30
4.6. Intéraction avec d'autres mycotoxines.....	30
Chapitre 5. Principaux effets biologiques	31
5.1. OTA et santé animale	31
5.1.1. Néphrotoxicité et perturbation de la fonction rénale	31
5.1.2. Effets sur la coagulation	34
5.1.3. Immunotoxicité	34
5.1.4. Neurotoxicité	35
5.1.5. Tératogénicité.....	36
5.1.6. Génotoxicité et mutagénicité	38
5.2. OTA et santé humaine.....	39
Chapitre 6. Détection et Dosage de l'OTA.....	44
6.1. Dosage de l'OTA par chromatographie sur couche mince (CCM)	44
6.2. Dosage de l'OTA par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	44
6.3. Méthode enzymatique de confirmation.....	46
6.4. Méthodes de couplage avec la spectrométrie de masse	47
6.5. Méthodes immunologiques	47
Chapitre 7. Moyens de prévention de l'OTA.....	48
7.1. Détoxification de l'OTA	48
7.1.1. Traitements physiques	48
7.1.2. Traitements chimiques	49

7.1.3. Combinaison de traitements chimique et physique	50
7.1.4. Traitements enzymatiques	50
7.2. Prevention des effets de l'OTA par l'emploi de molecules protectrices .	52
7.2.1. Effets protecteurs de la phénylalanine	52
7.2.2. Effets de la vitamine A sur la génotoxicité induite par l'ochratoxine A	55
7.2.3. Effets de la vitamine C sur la génotoxicité de l'OTA.....	55
7.2.4. Effets protecteurs du bicarbonate de sodium (Na HCO ₃).....	55
7.2.5. Effets protecteurs de la cholestyramine	56
7.3. Mesures d'hygiène ou bonnes pratiques agricoles.....	56

Chapitre 8. Présence naturelle de l'OTA dans les produits végétaux et animaux

I. Cas des épices.....	61
1. Histoire et origine des épices	61
2. Les différents types d'épices	62
2.1. Le gingembre.....	63
2.1.1. Origine et histoire du gingembre	63
2.1.2. Description du gingembre	63
2.1.3. Culture	64
2.1.4. Propriétés	65
2.2. Le piment.....	65
2.2.1. Origine et histoire du piment	65
2.2.2. Description du piment	66
2.2.3. Culture	67
2.2.4. Propriétés.....	68
2.3. Le poivre.....	68
2.3.1. Origine et histoire du poivre	68
2.3.2. Description du poivre	69
2.3.3. Culture	70

2.3.4. Propriétés du poivre	71
2.3.5. Importance économique des épices	71
Chapitre 9. Législation et réglementations en OTA sur les épices	72
1. Règlement portant fixation des teneurs maximales pour l'OTA concernant les épices	72
Conclusion partielle.....	74
DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA CONTAMINATION DES EPICES PAR L'OTA 75	
Chapitre 1. Matériel.....	76
1. Matériel utilisé.....	76
2. APPAREILLAGE	77
Chapitre 2. Méthodologie	78
1. Echantillonnage	78
1.1. Collecte des échantillons.....	78
1.2. Description des épices collectées	78
2. Mise au point de la méthode HPLC	80
3. Qualification de la méthode	82
3.1. Confirmation de la concentration de la solution mère de l'étalon au spectrophotomètre UV	82
3.2. Préparation de la gamme d'étalonnage	83
3.3. Détermination de la concentration de chaque échantillon	84
Chapitre 3. Résultats d'analyse.....	85
1. Résultat de la Collecte des échantillons	85
2. Résultat de la validation de la méthode.....	85
2.1. Exemple de chromatogramme.....	85
2.2. Linéarité.....	86
2.3. Autres paramètres de validation de la méthode d'analyse d'OTA	87
3. Niveau de contamination en µg/kg d'OTA dans le gingembre	87

4. Niveau de contamination moyenne en µg/kg d'OTA des échantillons de gingembre	88
5. Niveau de contamination en µg/kg d'OTA dans le piment	89
6. Contamination moyenne en µg/kg d'OTA dans le piment	90
7. Niveau de contamination en µg/kg dans le poivre	90
8. Etude comparée des trois matrices	90
8.1. Moyennes de concentration des 3 groupes d'échantillons en OTA.....	90
8.2. Comparaison des teneurs obtenues par rapport aux normes	91
Chapitre 4. Discussion et recommandations.....	93
1. Discussion	93
2. Recommandations	97
CONCLUSION.....	99
BIBLIOGRAPHIE	101
WEBOGRAPHIE	137
ANNEXES	

INTRODUCTION

Selon l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), environ 25% des récoltes mondiales des produits alimentaires sont contaminés par les mycotoxines (FAO, 2004). Les mycotoxines sont des contaminants naturels de l'alimentation humaine et animale produites par des moisissures toxinogènes.

Parmi les nombreuses mycotoxines existantes, certaines font l'objet de recherche systématique par les chercheurs. Ce sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, la fumonisine B1, la zéaralénone, les trichotécènes, la vomitoxine ou DON A l'heure actuelle, l'attention des chercheurs s'est portée sur l'ochratoxine A (OTA) du fait des effets toxiques qu'elles entraînent et de son incidence élevée dans les aliments. En effet, il a été démontré que l'OTA est clairement néphrotoxique, chez toutes les espèces animales et cancérogène chez les rongeurs (Castegnaro *et al.*, 1998; Pfohl-Leszkowicz 1999; Castegnaro 2001 ; Pfohl-Leszkowicz 2002;), elle a été impliquée dans la néphropathie des Balkans (Bulgarie, Roumanie, Serbie, Croatie, Bosnie et Herzégovine, Slovénie, et Macédoine) (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 2002). L'ochratoxine A a été classé par l'IARC comme un carcinogène humain probable (groupe 2B).

L'OTA est produite par les champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* principalement les *penicillia* dans les pays tempérés et les *Aspergillii* dans les régions chaudes. Elle est dangereuse pour la santé du consommateur et altère aussi la qualité marchande des produits. Elle est naturellement présente dans de nombreux produits végétaux tels que les céréales (orge, blé, maïs) et les fruits secs (Zinedine A. *et al.*, 2006 et 2007 b), le café, le vin, les olives (Mariana T. *et al.* 2008), le cacao (Dembélé A. *et al.*, 2009) et peut également contaminer les épices (Goryacheva *et al.*, 2006 ; Fatih O. *et al.*, 2012 ; Fazekas B. *et al.*, 2005) qui feront l'objet de notre étude.

En effet, les épices font partie de l'alimentation quotidienne des ivoiriens. Ils sont consommés crus et sont utilisés en cuisine. Les épices comptent parmi les produits de la chaîne alimentaire les plus contaminés par les mycotoxines. Leur

contamination est tributaire d'un bon nombre de facteurs dont : l'origine des plantes, l'écologie du milieu, les conditions de transport (hygrométrie et température), ainsi que le mode de récolte, de collecte, de préparation, du séchage, du stockage et du conditionnement (Richard-H, 1992).

Face aux risques d'exposition aux mycotoxines dans les produits alimentaires, plusieurs pays ont établi des normes fixant la quantité maximale de mycotoxine tolérée dans chaque produit. Cela va dans l'intérêt des consommateurs qui sont de plus en plus exigeants vis-à-vis de la qualité sanitaire des produits consommés dans l'intérêt de leur santé. Il est donc important pour les industriels agroalimentaires de procéder à des analyses systématiques, efficaces et rapides des denrées alimentaires en vue de la commercialisation des produits de bonne qualité.

La Côte d'Ivoire, pays de l'Afrique de l'Ouest, bordée au Sud par l'Océan Atlantique est caractérisée par un climat chaud et humide ce qui favorise la croissance des mycotoxines. Plusieurs travaux ont été entrepris pour rapporter la contamination dans les denrées alimentaires en Côte d'Ivoire notamment dans les céréales et les arachides (Sangaré et al, 2006) et dans le cacao et le café (Dembelé A. et al, 2008, 2009, 2012, 2013) par l'ochratoxine A.

Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur la présence de l'OTA dans les épices en Côte d'Ivoire d'où l'intérêt de notre étude. L'objectif général de la présente étude est donc de déterminer le niveau de contamination de l'OTA dans trois épices (le gingembre, le piment et le poivre)

Les objectifs spécifiques sont :

- Déterminer les teneurs en OTA dans les différents échantillons d'épices collectés
- Déterminer la teneur moyenne en OTA dans les différents échantillons d'épices
- Comparer les teneurs obtenues aux normes établies par la législation internationale

Nous présenterons notre travail en deux parties :

La première partie portera sur les généralités concernant l'ochratoxine A et les épices.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude de contamination des épices par l'OTA.

www.suit.com

PREMIERE PARTIE :
**GENERALITES SUR L'OTA ET
LES EPICES**

Rapport!

Chapitre 1 : Ochratoxine A

1. Découverte et origine de l'OTA

Les mycotoxines synthétisées par les champignons peuvent à forte concentration rendre inutilisable un lot d'aliments destiné à la consommation humaine ou animale. Des exemples d'intoxications fongiques avec des épidémies liées à l'ingestion d'ergot du champignon *Claviceps purpurea* ont été décrites depuis le moyen âge sous le nom de " Mal des ardents ou doigts de saint Antoine ". En 1944, une épidémie d'ergotisme tua près de 400 personnes en France. Les descriptions d'intoxications animales dues à des mycotoxines deviennent de plus en plus fréquentes mais il faudra attendre les années 60 pour que soit éclairci, grâce à la découverte des *aflatoxines*, le mystère de ces intoxications causées par les moisissures.

L'ochratoxine A a été isolée pour la première fois en 1965 par un groupe de chercheurs Sud-Africains à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus*, à l'occasion d'une recherche systématique de mycotoxine engagée à la suite d'intoxication provoquée par les aflatoxines (Van der Merwe et coll, 1965 a et b).

2 . Structure et propriétés physico-chimiques

2.1. Structure

L'ochratoxine A est constituée d'une molécule de 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyl en C₇, au groupement amine de la L-β-phénylalanine. (figure1)

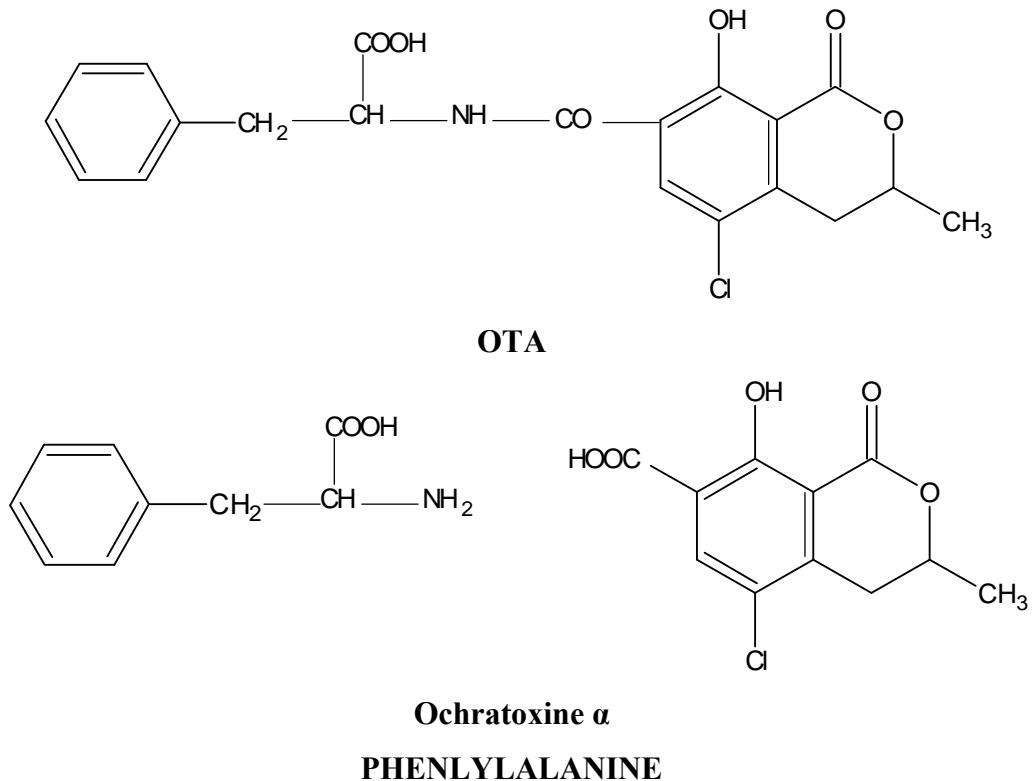


Figure 1 : Structure de l'OTA et de ses composants (Van der Merwe et coll. 1965)

2.2. Propriétés physico-chimiques

De formule brute C₂₀H₁₈ClNO₆, L'ochratoxine A est un composé cristallin, incolore et de masse moléculaire 403,8 g/mol. L'OTA possède un point de fusion de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène.

méthanol, l'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire (ε) de $5500 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dans le bicarbonate de sodium 0,1M (pH = 7,4), le maximum d'absorption de l'OTA est de 378 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $14700 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L'OTA a une fluorescence verte en milieu acide à 365 nm et bleue en milieu alcalin. Cette propriété est mise à profit pour sa détection et son dosage. Elle présente un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol 96% et à 428 nm dans l'éthanol absolu.

L'OTA est partiellement dégradée dans des conditions normales de cuisson car elle est thermostable, mais peut aussi être transformée en 3-S-OTA (Bruinink et coll, 1997). Des solutions d'OTA sont complètement dégradées par un excès d'hypochlorite de sodium (Castegnaro et coll, 1991).

L'OTA présente un certain nombre de dérivés représentés sur la figure 2 (Steyn et coll, 1970 ; Steyn et coll, 1967 ; Van der Merwe et coll, 1965a et b). Ces dérivés sont :

- l'ochratoxine α (OT α) qui est le dérivé isocoumarine obtenu à la suite de l'hydrolyse de la liaison peptidique avec élimination de phénylalanine
- l'ochratoxine B (OTB) qui est un dérivé non chloré de l'OTA et qui a un maximum d'absorption à 318 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $6500 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- l'ochratoxine C (OTC) qui est son ester éthylique.
- L'ochratoxine D (OTD) ou la 4-hydroxy-OTA (4(R)-OH-OTA) isolée à partir de culture de *Penicillium verrucosum* et qui a un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de $6400 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dans le méthanol.
- Analogues structuraux de l'OTA par substitution de la phénylalanine par d'autres acides aminés.

En 1992, Hadiane et coll ont isolé à partir de culture *d'Aspergillus ochraceus*, trois nouvelles molécules d'OTA dans lesquelles la phénylalanine est remplacée par la sérine, l'hydroxyproline ou lysine. (Figure 3)

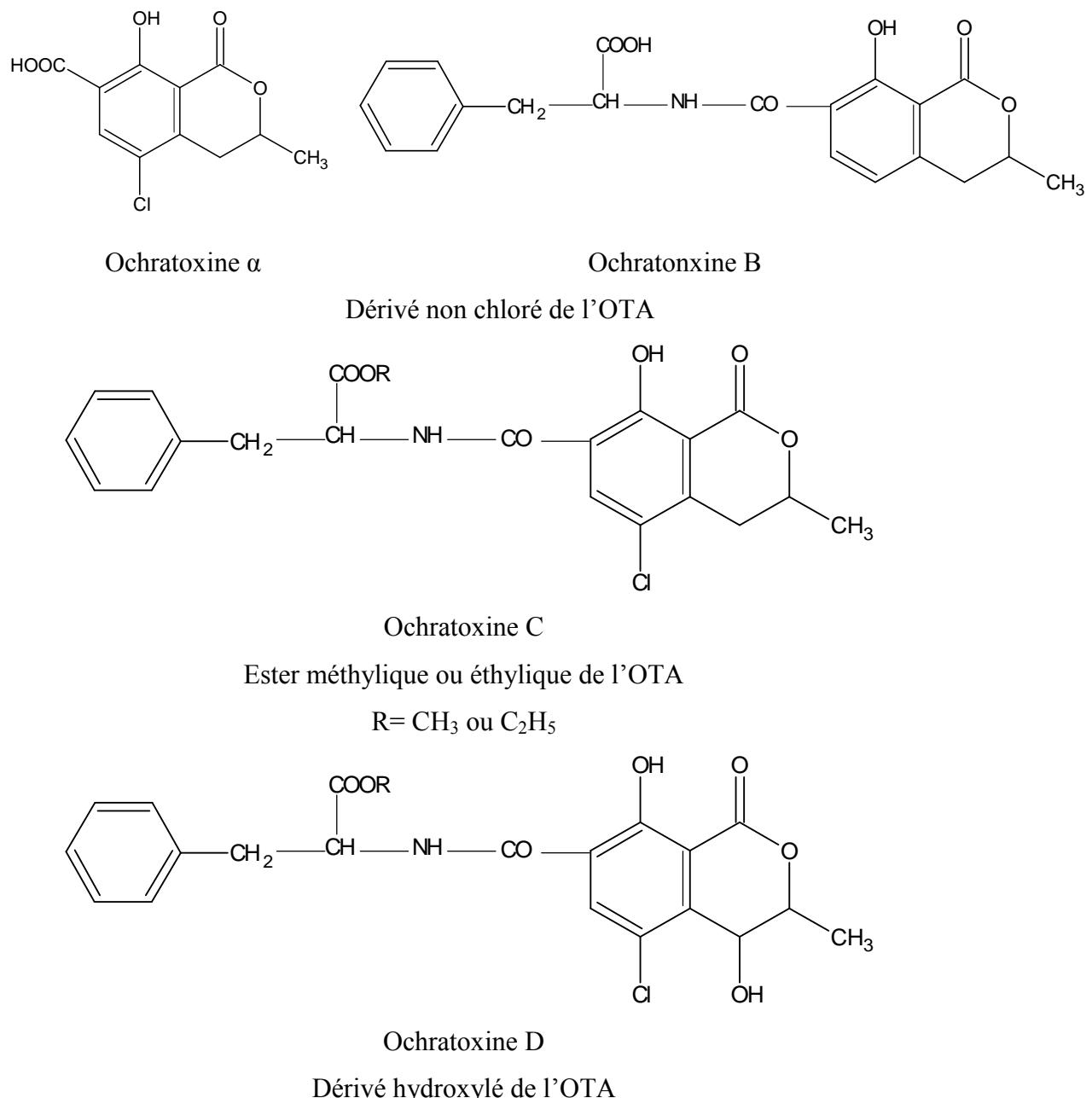
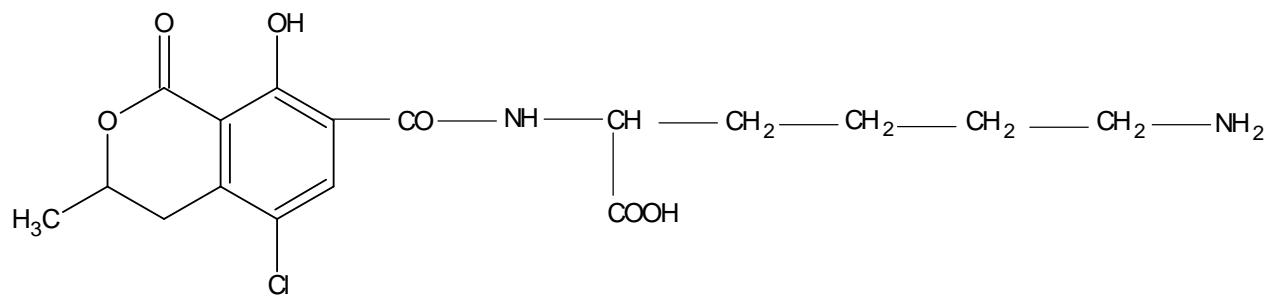
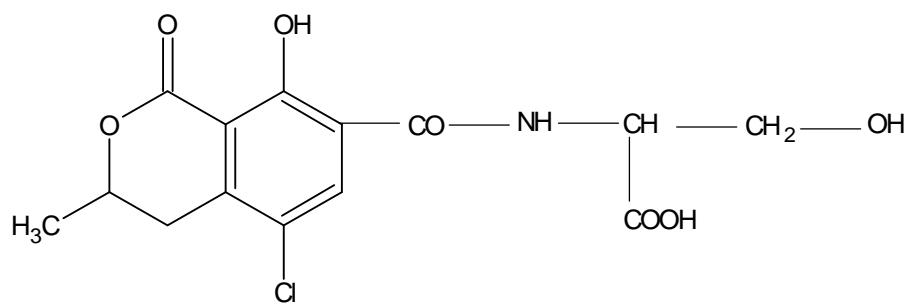


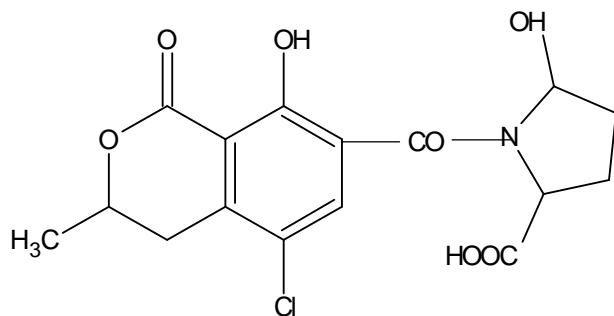
Figure 2 : Les dérivés de l'ochratoxine A



Lys-Ochratoxine



Ser- Ochratoxine



OH- pro-Ochratoxine

Figure 3 : Analogues naturels de l'ochratoxine A (Hadiane et coll.1992)

Chapitre 2 : Production et biosynthèse de l'OTA

2.1. Conditions naturelles de production de l'OTA

L'OTA est un métabolite secondaire produit par des champignons inférieurs : les moisissures. Les souches productrices sont répertoriées dans le tableau I.

Tableau I : les différentes espèces d'*aspergillus* et de *penicillium* productrices d'OTA (Holmberg et al., 1991)

<i>Aspergillus</i>	<i>penicillium</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>
<i>Aspergillus alliaceus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Aspergillus elegans</i>	<i>penicilliumcommune</i>
<i>Aspergillus fresenii</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
<i>Aspergillus melleus</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Aspergillus ostianus</i>	<i>Penicillium palpitans</i>
<i>Aspergillus petrakii</i>	<i>Penicillium purpureescens</i>
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Penicillium nordicum</i>
<i>Aspergillus sulphureus</i>	<i>Penicillium variabile</i>
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Penicillium verruculosum</i>

Parmi ces moisissures, certains genres produisent l'OTA. Il s'agit d'*Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* et de *Penicillium verrucosum*... Les moisissures toxinogènes se développent sur les productions agricoles dans les champs, pendant les traitements post-récoltes et surtout au cours de leur stockage. La production d'OTA est liée aux conditions de température, d'humidité ambiante, et de teneur en eau du support contaminé (A_w) (Pitt, 1987).

Les valeurs minimales d' A_w pour la production d'OTA oscillent entre 0,83 (83 %) et 0,90 (90 %) en fonction de la moisissure étudiée (Northolt et coll, 1979). La température optimale de production d'OTA par *Aspergillus ochraceus* est de 28°C, cette production est moins importante à 15°C ou 37°C (Trenk et coll, 1991). Au contraire, *Penicillium viridicatum* croît dans une gamme de température qui varie de 4°C à 30°C en présence d'une humidité de 22% (Mislove et tuite, 1970). Dans les régions froides, l'OTA est plutôt produite par

les *Penicillia*, alors que dans les régions chaudes, ce sont les *Aspergillii* qui la synthétisent (Pohland et coll, 1992). Ainsi, la production d'OTA est liée à la physiologie propre de chacune des espèces et aux paramètres écologiques. En Europe et au Canada, *Penicillium verrucosum* est considérée comme la principale moisissure productrice d'OTA dans les céréales (JECFA, 2002). L'OTA se formerait préférentiellement sur les aliments plutôt acides (Cuero et coll, 1987). Les concentrations en OTA retrouvées dans les aliments sont très variables et varient de quelques ng/kg jusqu'à plusieurs dizaines de mg/kg (Krogh, 1987).

Les moisissures produisant l'OTA peuvent également produire d'autres toxines ou cohabiter avec d'autres moisissures produisant des toxines différentes comme la citrinine produite par des *Penicillia* (Kanisawa, 1984 ; Krogh et coll, 1973) ou des aflatoxines produites par *Aspergillus flavus*. Un phénomène de synergie avec l'OTA peut se produire et compliquer l'attribution à la seule OTA de ses effets toxiques (Molinie, 2004 ; Pfohl-leszkowicz et coll, 2002 b).

2.2. Production de l'OTA en laboratoire

En laboratoire, des progrès considérables en ce qui concerne la production d'OTA ont été réalisés à partir des cultures effectuées soit en milieu liquide, soit en milieu solide.

2.2.1. Culture en milieu acide

Divers facteurs ont une influence sur la production d'OTA obtenue à partir de culture en milieu liquide (Sansing et coll, 1973)

2.2.1.1. La température

La température est un facteur déterminant pour la croissance du champignon et la production de mycotoxine. Sansing et coll (1973) ont montré

que la température optimale de production d'OTA à partir d'une culture d'aspergillus varie entre 20° et 25°C.

2.2.1.2. Le pH et le temps d'incubation

Le temps d'incubation est un facteur très important pour l'obtention d'un bon rendement. Le temps optimum nécessaire à la production d'OTA à partir d'une souche d'*Aspergillus ochraceus* NRL 3174 cultivée sur un milieu nutritif renfermant 4% de saccharose et 2% d'extrait de levure varie entre 10 et 14 jours à 25°C (Sansing, 1973).

A des pH relativement élevés de l'ordre de 7.6 à 8.4, on a une forte production d'OTA après 14 jours d'incubation à 25°C (Sansing et coll, 1973).

2.2.1.3. Oxygénation et substrat

D'autres facteurs tels que le degré d'oxygénation et la nature du substrat utilisé influent également sur la production d'OTA (Sansing et coll, 1973). Des travaux effectués au laboratoire de l'université de BORDEAUX II sur l'influence du substrat et du temps d'incubation, ont permis d'optimiser la production d'OTA à partir de la souche d'*Aspergillus ochraceus* (Creppy et coll, 1993).

2.2.2. Culture en milieu solide

De nombreux travaux réalisés sur la production d'OTA à partir de cultures d'*Aspergillus ochraceus* et de *Pénicillium verrucosum* effectuées sur différentes graines de céréales (maïs, seigle, orge, blé, avoine...), montrent que toutes les souches ne sont pas également toxinogènes et qu'une souche toxinogène peut perdre cette propriété après plusieurs repiquages (Galtier, 1977). En 1975, Lindenfelser L.A et Ciegler A ont obtenu un rendement de 4 mg/g à partir de la souche d'*Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 cultivée sur du maïs. D'après ces

auteurs, le temps optimum nécessaire à la production de la toxine, à la température de 28°C, varie entre 7 et 14 jours, selon le substrat utilisé.

Tout comme dans le cas des cultures en milieu liquide, la température, le temps d'incubation et la nature du substrat sont des paramètres déterminants pour les cultures en milieu solide.

2.3. Biosynthèse de l'OTA

L'OTA est la condensation d'un noyau isocoumarinique avec un acide aminé : la phénylalanine. D'après Steyn et coll (1970) la biosynthèse de la partie isocoumarinique résulterait de la condensation de cinq unités acétates suivie de l'incorporation en position 7 d'un atome de chlore. En 1971, Yamazaki et coll soutiennent plutôt que le noyau isocoumarinique est la résultante de la condensation d'unités acétates et malonate suivie de l'introduction en position 7 d'un atome de chlore grâce à l'action d'une chloropéroxydase.

Dans l'un ou l'autre des cas, l'OTA synthétase serait l'enzyme responsable de la formation de la liaison amide entre la partie isocoumarinique et la phénylalanine.

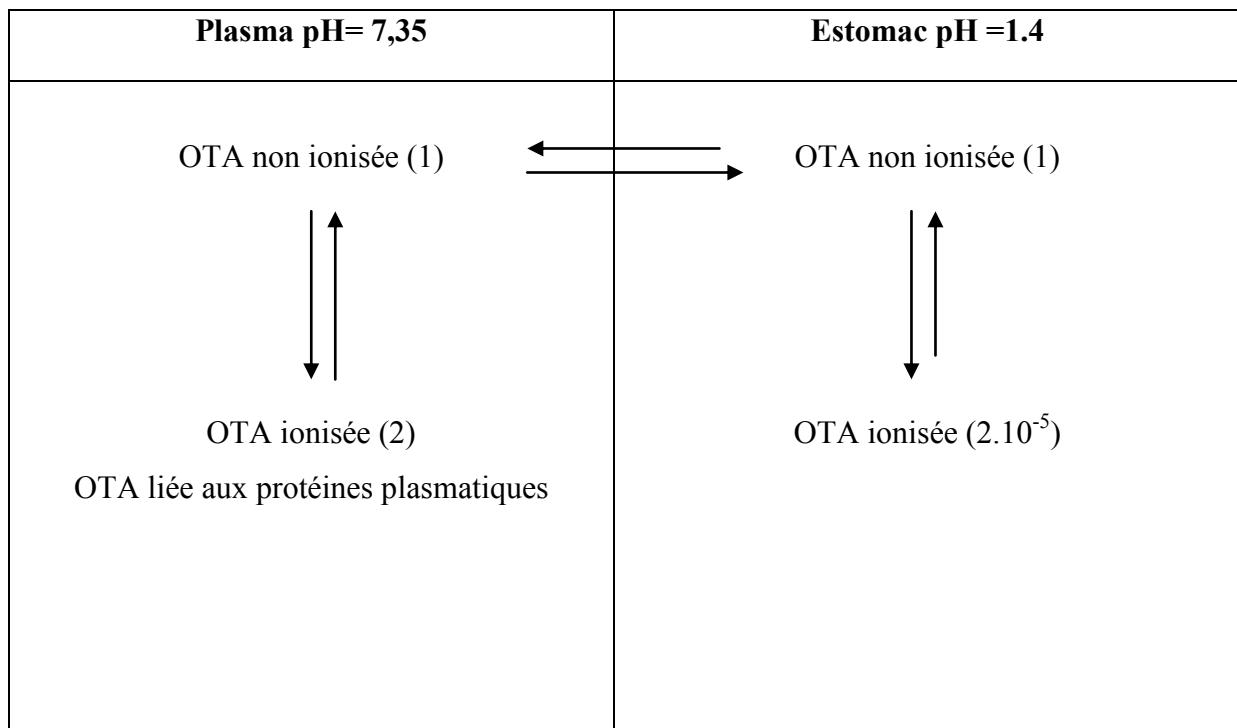
Chapitre 3 : Devenir et toxicité de l'OTA

3.1. Absorption

Administrée à l'animal par voie orale, voie naturelle de contamination, l'OTA, une fois ingérée, est partiellement absorbée par diffusion passive de la forme non ionisée à travers la paroi gastrique (Galtier et coll., 1981). Cependant une faible quantité est absorbée au niveau de l'estomac.

La figure 5 illustre la distribution théorique de l'OTA entre le contenu gastrique (pH 1,4) et le plasma (pH 7,35). Le site principal d'absorption se situe au niveau de l'intestin grêle et plus précisément au niveau de la partie proximale du jéjunum (Kanisawa et Suzuki, 1990). Le taux d'absorption de l'OTA au niveau de l'intestin est respectivement de 66% chez le porc, 56% chez le rat et le lapin, 40% chez le poulet (Galtier et coll., 1981 et 1979b). Elle est ensuite distribuée aux différents organes via le système porte à partir du foie (Kumagais et Aibara, 1982).

Des études récentes montrent que l'absorption s'effectue aussi par des transporteurs. Ainsi, l'OTA pénètre dans la cellule principalement par transport actif. En 1988, Kumagais a montré qu'au niveau intestinal l'OTA est absorbée par les cellules intestinales humaines Caco-2, probablement par diffusion passive, mais que cette absorption est limitée par une pompe à efflux actif localisée sur la face apicale des cellules. L'absorption peut également se faire par voie pulmonaire avec une biodisponibilité de 98% chez le porc (Brown et coll., 1976).



Les chiffres entre parenthèses indiquent, au niveau du compartiment, les proportions respectives des formes ionisées et non ionisées.

Figure 4 : distribution théorique de l'OTA entre le suc gastrique et le plasma (Galtier, 1974a)

3.2. Distribution

a. Distribution plasmatique et liaison aux protéines

On ne retrouve que peu d'OTA sous forme libre dans le sang. En effet, l'OTA a une très grande affinité pour certaines protéines plasmatiques où elle est fixée à 90% (Hagelberg et coll., 1989). L'OTA se fixe sur l'albumine sérique (avec une constante d'affinité ($k_{\text{affinité}}$) de $5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ chez l'homme) (Galtier et coll., 1979b) et aussi à une macromolécule sérique non identifiée de masse moléculaire 20000Da ($k_{\text{affinité}} = 2,3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ chez l'homme). L'affinité de cette macromolécule pour l'OTA est 10^6 fois supérieure à celle du sérum albumine (Galtier, 1974a ; Galtier et coll., 1981 ; Hagelberg et coll., 1989 ; Stojkovic et

coll., 1984). Le mécanisme par lequel l'OTA se lie aux protéines est mal connu. Une étude rapporte que l'OTA, sous forme de di-anion, est liée au niveau des sites de fixation de l'albumine sérique (II'Ichev et coll., 2002a). Cette fixation retarde donc le transport de l'OTA vers les différents organes et augmente sa demi-vie sérique et par conséquent contribuerait au développement des effets toxiques chroniques de cette toxine.

C'est chez les humains que l'OTA possède la plus longue demi-vie dans le plasma qui est estimée à 1 mois (Studer-Rohr et coll., 2000). Elle est de 21 jours chez le singe, 72-120 heures chez le porc, 55-120 heures pour le rat

L'OTA subit un cycle entérohépatique responsable en partie de sa très longue demi-vie dans l'organisme (Fuchs et coll., 1988b ; Roth et coll., 1988).

Tableau II : Demi-vie plasmatique de l'OTA, après administration orale
D'une dose unique.

espèces	Demi-vie (heures)	Références
Rat	55-120	Galtier et coll. (1979)
Poulet	4,1	Galtier et coll. (1981)
Macaque	510	Hagelberg et coll. (1989)
Porc	72-120	Galtier et coll. (1981)

b. Distribution tissulaire

L'OTA est distribuée dans l'organisme à travers la circulation sanguine avec une très bonne diffusion tissulaire. Les organes les plus réceptifs sont les reins, le foie, les testicules, l'intestin, les muscles et le tissu adipeux (organe de réserve) avec toutefois une meilleure concentration dans les reins et le foie (Albassam et coll., 1987 ; Galtier, 1974b).

La distribution tissulaire, que ce soit pour le porc, le poulet ou la chèvre, s'effectue dans l'ordre décroissante suivante : reins > foie et muscles > graisses (Harwig et coll., 1983 ; Mortensen et coll., 1983). De récents travaux ont permis

de déceler la présence de la toxine dans le cerveau de jeunes rats sans qu'il ait été possible de préciser s'il s'agit d'un passage à travers la barrière hémato-encéphalique ou d'un passage dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). D'autres études effectuées sur des souris ont montré que l'OTA franchissait la barrière foeto-placentaire et était transmise de la mère aux fœtus (Fukui et coll., 1987a). L'OTA passe également dans le lait.

Barnikol et Thalman ont trouvé chez des porcins nouveau-nés, des concentrations sériques de 0.075 à 0.12 ng/ml contre 0.2 ng/ml chez la truie génitrice de ces porcins. Ces observations témoignent de la présence d'OTA à tous les niveaux de l'organisme, ce qui tend à démontrer l'importante capacité de diffusion de la toxine.

3.3. Métabolisme

3.3.1. Métabolisme de la partie phénylalanine

a. Hydrolyse de la liaison peptidique

In vitro, l'OTA est hydrolysée en Ota et en phénylalanine par des enzymes protéolytiques de digestion : l' α – chymotrypsine et la carboxypeptidase (Pitout, 1969). Selon Xiao et coll. (1996), le groupement phénylalanine permet à l'OTA d'être guidée vers les cibles cellulaires ce qui expliquerait le peu de toxicité de l'OT α . Ainsi l'OT α est dénuée de toxicité aiguë mais conserve une partie de la génotoxicité de la molécule de départ (Föllmann et coll., 1995).

In vivo, des homogénats pancréatiques, de l'iléon et du duodénum de rats sont capables d'hydrolyser l'OTA, tandis que cette activité au niveau rénal ou hépatique est quasiment nulle (Suzuki et coll., 1977), voire inexiste dans les hépatocytes de rat (Hansen et coll., 1982). Kumagai et Aibara (1982) ont montré que l'OTA circule du foie vers la bile, avant d'être évacuée dans l'intestin où elle est hydrolysée en OT α . D'après Storen et coll. (1982a et b), la présence

d'OTA serait due à un phénomène de réabsorption à partir de l'intestin où se forme ce métabolite.

b. Hydroxylation

Une autre voie de métabolisation de la phénylalanine conduit à l'obtention de la tyrosine-OTA, formée suite à l'hydroxylation en position 4 du cycle aromatique de la phénylalanine par la phénylalanine hydroxylase (Creppy et coll., 1990 ; Stormer et coll., 1983).

3.3.2. Métabolisme de la partie isocoumarinique

a. Hydrolyse de la fonction lactone

Le groupement isocoumarinique serait responsable de la toxicité via la formation d'une forme ouverte de l'OTA (OP – OTA) à la suite de l'hydrolyse de la fonction lactone dans certaines conditions physiologiques. Xiao et coll. (1996) constatent que dans la bile de rats traités par l'OTA (mais pas dans l'urine ou le sang), environ 50% de cette OTA est de l'OP–OTA et que cette forme ouverte est encore plus毒ique que l'OTA chez l'animal. Ils ont également constaté que l'OTA se liait aux macromolécules biologiques par une liaison ester covalente impliquant le groupement carbonyle de cette fonction lactone et concluent que cette liaison, serait responsable de la toxicité et génotoxicité de l'OTA qui se lierait respectivement aux protéines enzymatiques et acides nucléiques.

b. Hydroxylation de la partie dihydro-isocoumarinique

Xiao et al (1996) ont montré qu'en présence de NADPH, l'OTA est métabolisée en métabolites hydroxylés par le système microsomal des monooxygénases à cytochrome P450 (Grosse et coll., 1997b ; Omar et coll., 1996 ; Oster et coll., 1991 ; Ueno, 1985).

Trois métabolites hydroxylés ont été identifiés (figure 5) :

- l'épimère 4 (R) de la 4-OH-OTA majoritairement produit par l'intermédiaire de microsomes de foie humain et de rat.
- l'épimère 4 (S) surtout produit par des microsomes de porc (Stormer et coll., 1981).

Ces 2 métabolites peuvent aussi être générés par les microsomes de reins (Hietanen et coll., 1986) et dans des cultures de reins de singe. Ils sont des métabolites moins toxiques que l'OTA (Creppy et coll., 1983a et b ; Stormer et coll., 1983).

- la 10-OH-OTA, formée suite à l'incubation de l'OTA avec des microsomes de foie de lapin (Stormer et coll., 1983).

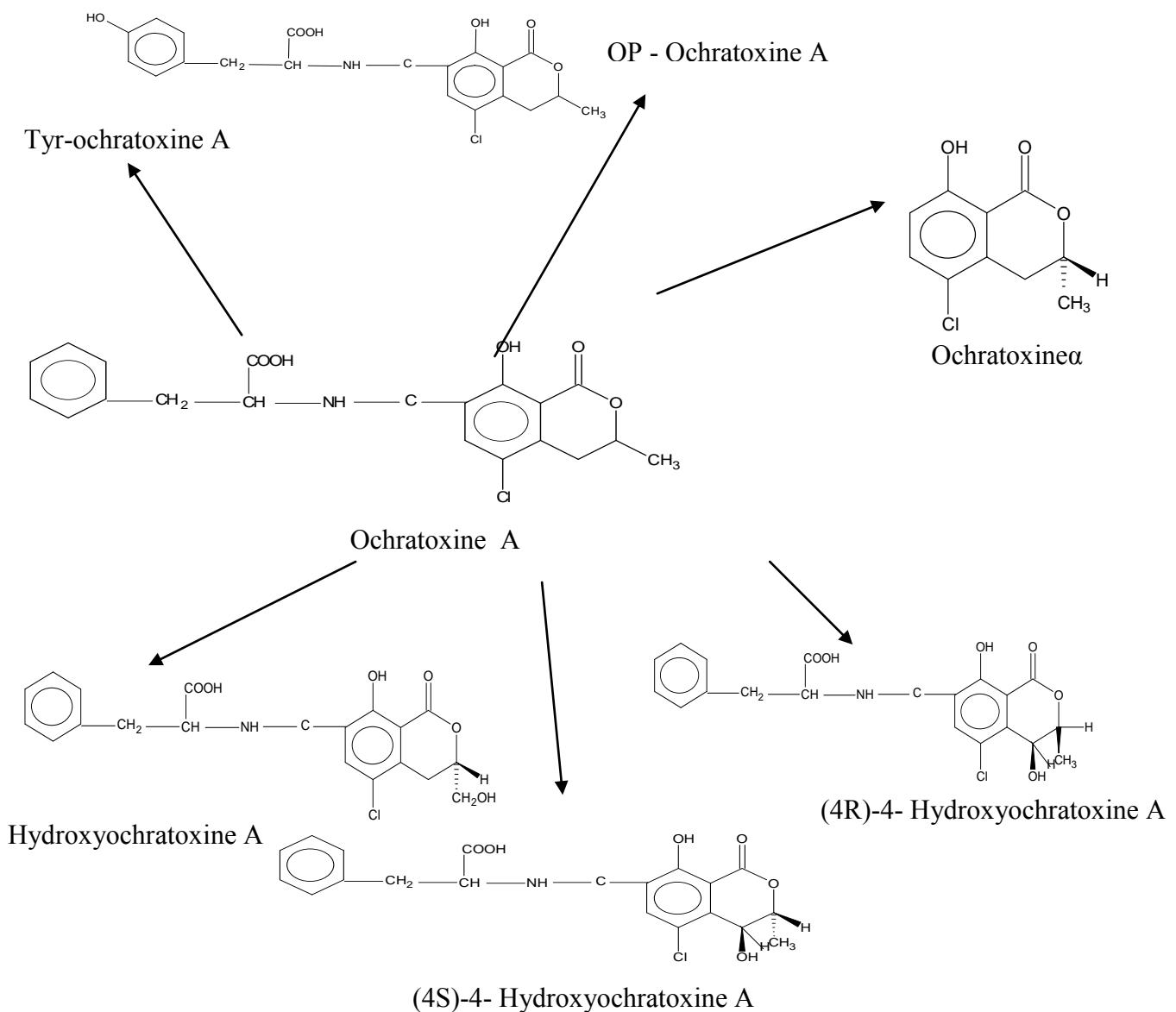


Figure 5 : Dérivés hydroxylés de l'OTA produits par les cytochromes –P450 et la phénylalanine hydroxylase (Stormer et coll. 1981, 1983 ; Creppy et coll. 1990)

3.3.3. Métabolisme de l'OTA par conjugaison au glutathion

La voie de métabolisation par conjugaison au glutathion est généralement considérée comme une voie de détoxification (Jakoby et Habig, 1980). Néanmoins, certains dérivés provenant de la conjugaison au glutathion génèrent des composés électrophiles pouvant être mutagènes et cancérogènes (Dekant et Van Vakas, 1980 ; Van Blander et coll, 1980). De plus, il est évident que l'accumulation de conjugués du glutathion peut être néphrotoxique dans certains cas (Monks et Lau, 1987). Deux classes de conjugués peuvent être distinguées :

- ceux agissant directement, sans activation métabolique (leur action est donc indépendante des microsomes) (OTA-GSH)
- ceux devenant génotoxiques après métabolisation (métabolites- GSH).

Pfohl-leskowicz et coll. (1993a) ont confirmé par leurs travaux le rôle primordial du glutathion dans la génotoxicité de l'OTA, soit par la formation de dérivés conjugués génotoxiques, soit par ses propriétés oxydoréductrices.

3.3.4. Autres voies de métabolisation

- La glucuroconjugaison et la sulfoconjugaison au niveau du foie grâce à la glucuronyl transférase et sulfotransférase
- Les voies oxydatives qui conduisent à des manifestations toxiques provoquées par l'OTA
- L'OTA pourrait également être activée en métabolites réactifs par la voie de cooxydation des prostaglandines synthétases, notamment par la prostaglandine H synthétase (PGHS) (Pfohl-Leszkowicz, 1994b)

3.4. Excrétion de l'OTA et de ses métabolites

L'ochratoxine A est éliminée par la voie fécale, biliaire et essentiellement par la voie urinaire sous forme d'OTA inchangée ou sous forme d'Ota (Storen et coll.,

1982a). L'excrétion cumulée 120 heures après une administration per os d'OTA correspond à :

- 11% d'OTA et 23% d'OT α dans les fèces
- 11% d'OTA et 12% d'OT α dans les urines
- 33% dans la bile (Suzuki et coll., 1977)

Une partie de l'OTA qui se retrouve dans la bile peut être réabsorbée au niveau de l'intestin (Fuchs et coll., 1988b). Dans le rein, l'OTA est filtrée au niveau du glomérule puis sécrétée au niveau du tube contourné proximal dans la lumière tubulaire. 30 à 40% d'OTA sont éliminées par voie urinaire (Storen et coll., 1982a). Seulement 25% de l'OTA au niveau du tubule proviennent de la filtration glomérulaire. Le reste est issu de la sécrétion active de l'OTA vers la lumière tubulaire par les transporteurs des anions organiques (Schwerdt et coll., 1997). L'OTA sécrétée dans l'urine est en partie réabsorbée au niveau des tubules rénaux, ce qui conduit à son accumulation dans les cellules rénales et éventuellement à son retour dans la circulation sanguine. L'excrétion biliaire et la filtration glomérulaire suivie d'une excretion et réabsorption au niveau du tube contourné proximal, jouent un rôle important dans la clairance corporelle totale de l'OTA (figure 7). La contribution et l'intensité de chacune de ces voies sont fonction de la dose, de la distribution tissulaire, de la voie d'administration, du métabolisme de la toxine et du degré de fixation aux macromolécules sériques.

3.5. Etude toxicologique chez l'animal

3.5.1. Toxicité aigüe

La toxicité de l'OTA est très variable. Plusieurs facteurs contribuent à la toxicité de l'OTA : sa grande biodisponibilité, sa clairance plasmatique basse et sa longue demi-vie. Comme le montre le tableau III qui représente les valeurs de la dose létale 50 (DL_{50}) de plusieurs espèces animales selon diverses voies d'intoxications.

Tableau III : DL₅₀ de l'OTA chez différentes espèces animales

(Harwig et Coll., 1983)

Espèces	valeurs de DL ₅₀ en mg/kg de poids corporel		
	voie orale	voie intrapéritonéale	voie intraveineuse
Souris	46-58	22-40	26-34
Rat	21,4-30,3	12,6-14,3	13
Rat nouveau-né	3,9	-	
Chien	0,2	-	-
Porc	1	-	
poulet	3,3	-	

Ce tableau montre que le chien et le porc sont les espèces les plus sensibles à l'OTA. Une diminution de la DL₅₀ peut être observée suite à la synergie d'action entre OTA et l'acide pénicillinique ou la citrinine. Di Paolo et al. (1993) ont décrit un cas d'intoxication aiguë par inhalation d'*Aspergillus ochraceus*, ayant provoqué une atteinte rénale (oligurie et tubulonécrose).

Les toxicoses aiguës se caractérisent selon Chu et coll. (1975) par des dommages rénaux, une anorexie accompagnée d'une perte de poids, des vomissements, une température rectale élevée, l'apparition de conjonctivites, une déshydratation, un affaiblissement général. La mort de l'animal intervient deux semaines après administration de la toxine. Au cours de l'intoxication aiguë, des modifications enzymatiques ont été décrites. Après administration sous-cutanée d'OTA chez le rat, l'on a observé une diminution du niveau de muranidase suivie par la diminution de LDH, de phosphatases alcalines (PAL), de glutamate déshydrogénase et de phosphatases acides dans les reins de ce dernier.

3.5.2. Toxicité subaigue ou subchronique

Elle permet la mise en évidence d'effets toxiques après administration répétée quotidienne ou fréquente d'une ou plusieurs doses faibles de la substance à tester (Tableau IV). La durée n'excède pas 90 jours.

La toxicité subaiguë permet d'avoir des renseignements sur la réversibilité ou l'irréversibilité des effets et précise si ces effets sont cumulatifs ou retardés.

Elle permet également le choix des doses pouvant être utilisées lors des études à long terme. Dans le cas de l'OTA, le rein est l'organe cible, mais la toxine a également d'autres effets toxiques (Pohland et coll., 1992). Des études de toxicité subaiguë chez certains animaux, ont entraînés :

- 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 (Hagelberg et coll., 1989) ;
- une myélotoxicité chez la souris (Boorman et coll., 1984 ; Müller et coll., 1995)
- une fragilité intestinale et des lésions rénales chez le poulet (Elling et coll., 1975)
- une diminution de la production d'œufs chez la poule

Tableau IV : résultats d'études toxicologiques subaiguës chez certaines espèces

Espèces	Voie D'administration	Dose (mg/kg /PC) [mg/kg aliment]	Temps jours)	Effets	Références
Rat wistar	Orale par Alimentation	0.24-2.4 [2.4-24]	14	-Retard de croissance -hyperurémie -diminution du volume d'urine -augmentation du poids des reins et lésions rénales	Munro et coll. (1974)
Rat sprague-Dawley	Intrapéri-tonéale	0.75-2	5-7	-Perte de poids -augmentation du débit urinaire -hypoprotéinurie -augmentation de la glucosurie -réduction du transport urinaire de substances organiques.	Berndt et Hayes (1979)
Rat fisher 344/N	Orale par gavage	0.06-1	91	-Retard de croissance -réduction relative du poids des reins -cardiomégalie -nécrose tubulaire rénale -néphropathie rénale	Programme national de Toxicologie (1989)
Chien	Capsule par voie orale	0.1-0.2	14	-aucun changement fonctionnel des reins - nécrose tubulaire rénale -nécrose du thymus	Kitchen et coll(1977a,b)
Porc	Voie orale par Alimentation	8.10^{-3} , 0.04, 0.2 [0.21-5]	5-90	-d'importantes perturbation de la fonction rénale -diminution et /ou augmentation du taux des enzymes rénaux.	Elling (1979a) ; krogh et coll. (1988)

3.5.3. Toxicité chronique

La toxicité chronique permet de mettre en évidence les effets toxiques après administration répétée quotidienne ou fréquente d'une ou plusieurs doses de substances à tester pendant une longue période (supérieurs à 90 jours) ; cette période peut aller jusqu'à 18 mois voir plus.

Les études de toxicité chronique se font lorsque la substance toxique demande un long temps de latence, soit pour s'accumuler en quantité suffisante, soit pour exprimer l'effet toxique. L'étude chronique permet par ailleurs, de définir les doses limites ou seuils limites de contamination qui sert de base à la fixation chez l'homme de la dose journalière tolérable (DJT).

Les effets chroniques de l'OTA se manifestent aussi bien chez les animaux que chez l'homme avec le cas de la néphropathie endémique des Balkan.

Effets chroniques chez les animaux : quelques exemples

➤ cas des souris

Des travaux sur des souris de laboratoire nourris avec les aliments contaminés par l'OTA à différentes doses (3.5 µg /kg de PC ; 5.6 µg/kg de PC ; 7 µg/kg de PC) pendant une période allant de 44 à 70 semaines ont montré l'existence de deux types de tumeurs rénales : une tumeur bénigne à type d'adénome papillaire et une tumeur solide des cellules rénales, lesquelles contenaient des cellules atypiques et considérée comme tumeur maligne. Les lésions rénales étaient fréquentes et multiples avec présence de cellules épithéliales atypiques et une dilatation des tubules. Aucune métastase au niveau rénale, ni de tumeurs hépatiques n'a été observée.

➤ cas du porc

Des études réalisées sur des porcs recevant une alimentation contaminée par l'OTA à des doses de 200 à 400 µg/kg d'aliment, ont montré l'existence d'une néphropathie nommée néphropathie porcine (Krogh et coll., 1987 et 1974). On note également, une augmentation de la prise d'eau, un excès d'urines et une diminution du poids des animaux. Pour des doses supérieures à 5 mg/kg d'aliment, d'autres organes sont touchés, notamment le foie, les intestins, la rate, les tissus lymphoïdes et les leucocytes.

➤ Cas des poussins

Des poussins nourris pendant trois semaines par des aliments contaminés par l'OTA ont montré une diminution du poids de 0 à 80% selon la dose administrée.

➤ cas des poules

Des poules pondeuses nourries pendant six semaines avec des aliments contaminés par l'OTA à 5 mg/kg avaient montré une réduction de la production d'œufs. Il est à noter que chez la volaille, le rein reste également l'organe cible de l'OTA (Dwivedi et Burns, 1984 et 1986).

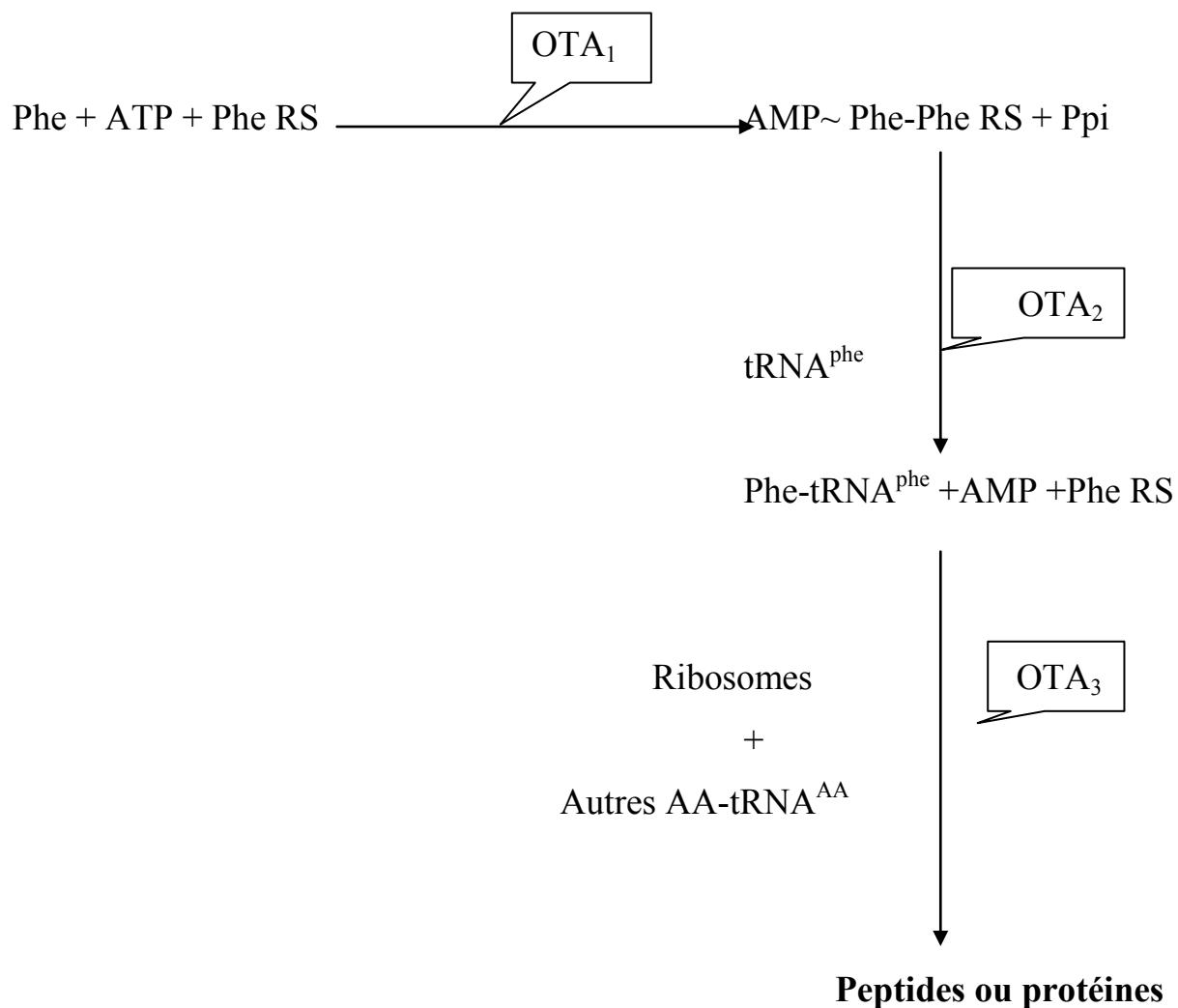
Chapitre 4. Mécanisme d'action de l'OTA

4.1. Mode d'action au niveau de la transcription et de la traduction

In vitro, l'OTA inhibe spécifiquement la synthèse des protéines en entrant en compétition avec la phénylalanine lors de la réaction d'amino-acylation de l'ARN de transfert phénylalanine-tARN par la phénylalanyl-tARN synthétase (figure 8) (Bunge et coll., 1978 ; Creppy et coll., 1983 et 1979a et b). Il en résulte un arrêt de la réaction d'amino-acylation et l'élongation peptidique. La synthèse d'ARN messager peut également être inhibée (Meisner et coll., 1983). Ce mécanisme d'action a été démontré aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes. C'est l'équipe du professeur Rösenthaler (1988) qui, le premier a mis en évidence une accumulation de nucléotides régulateurs (magic spots) chez *bacillus subtilis*.

Cette accumulation a été interprétée comme le signe d'une amino-acylation incomplète d'un acide ribonucléique de transfert (tRNA) ; il s'agit du tRNA phénylalanine (tRNA^{phe}). Ces mêmes auteurs ont également montré que les préparations purifiées de phénylalanyl-tRNA synthétase de *bacillus subtilis* étaient inhibées par l'OTA. Par ailleurs, Bunge et coll. (1979) ont rapporté la preuve qu'un système de synthèse de polyphénylalanine dirigé par la polyuridine était inhibé par l'OTA et qu'en présence d'un tRNA phénylalanine amino-acylé par la phénylalanine, l'inhibition disparaissait. Il apparaît donc nettement que l'OTA empêche la fixation de la phénylalanine sur son tRNA spécifique.

Creppy et Coll. (1979a et b) ont montré dans une étude systématique du mode d'action de l'OTA sur les organismes supérieurs, que l'OTA inhibait les deux réactions catalysées par la phénylalanyl-tRNA synthétase ; à savoir d'une part, l'activation de la phénylalanine et d'autre part, sa fixation sur le tRNA (inhibition compétitif vis-à-vis de la phénylalanine).



Phe	= phénylalanine
Phe RS	= phénylalanyl-tRNA synthétase
tRNA ^{phe}	= RNA de transfert de la phénylalanine
OTA	= action inhibitrice de l'OTA

- 1 : Inhibition de l'activation de la phénylalanine
- 2 : Inhibition de la fixation de la phénylalanine sur son tRNA spécifique
- 3 : arrêt de l'élongation peptidique

Figure 6 : Mode d'action de l'OTA sur la synthèse des protéines.

4.2. Mode d'action au niveau du métabolisme glucidique

L'OTA entraîne une baisse de 25% de la néoglucogenèse rénale (qui constitue une des voies majeures du métabolisme des glucides au niveau rénal) chez des

rats traités avec 2 mg d'OTA par Kg de nourriture pendant 2 jours (Meisner et coll., 1983). Cet effet provient de l'inhibition par l'OTA de la synthèse d'ARN messager (ARN_m) codant pour la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) enzyme clé de la néoglucogenèse (Krogh et coll., 1988 ; Meisner et coll, 1979, 1981 et 1983). Ceci étant, l'OTA inhibe donc la néoglucogenèse rénale essentiellement à partir du pyruvate. L'OTA peut avoir un effet hyperglycémiant lié d'une part à la stimulation de la glycogénolyse et d'autre part à la formation de glucose à partir d'autres nutriments, notamment d'acides aminés glucoformateurs (Verma et Shalini, 1998).

4.3. Perturbations oxydatives

Omar et coll (1990 et 1991a) ont démontré récemment *in vivo* et *in vitro*, le mécanisme de la lipopéroxydation. L'OTA, ajoutée à des microsomes de foie et de reins de rat en présence d'un agent réducteur (NADPH) et de fer, augmente la peroxydation lipidique. Le fer et les autres métaux dits de transition ont en effet la capacité de jouer le rôle d'agents radicalaires lorsqu'ils sont complexés par certaines molécules organiques; c'est le cas de l'OTA qui va chélater les ions Fe³⁺. Il en résulte la formation d'un complexe en OTA-Fe³⁺ très facilement réduit par une oxydoréductase à NADPH, H⁺ (NADPH-CYP 450 réductase). Cette réduction des ions Fe³⁺ en Fe²⁺ s'accroît très largement en présence d'OTA (Omar et coll., 1990 et 1991a ; Rahimtula et coll., 1988). Le complexe OTA-Fe²⁺ ainsi formé à son tour cède un électron à l'oxygène moléculaire pour former différents dérivés radicalaires. Il s'en suit à l'intérieur de la membrane au niveau des acides gras poly-insaturés des phospholipides membranaires, tout un processus de réactions en chaîne qui aboutissent à la peroxydation lipidique ainsi qu'à d'autres effets toxiques au niveau cellulaire (figure 8) (Clavel et coll., 1985 ; Esterbauer, 1993 ; Van Ginkel et Sevanian, 1994 ; Wagner et coll., 1994). Les lipopéroxydes et les aldéhydes libérés propagent " l'attaque radicalaire " non seulement à l'intérieur de la cellule, mais également à distance, ce qui génère

des altérations tissulaires structurales. Au début du processus, il se produit une simple désorganisation de la membrane, puis un défaut de fluidité et des perturbations de plus en plus marquées pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Clavel et coll., 1985).

In vivo, chez le rat, l'administration d'OTA à forte dose (6 mg/kg) provoque également une peroxydation lipidique mesurée par le dosage de l'éthane expiré. Meki et hussein (2001) ont montré que l'utilisation de mélatonine (connue pour son pouvoir antioxydant), réduisait le stress oxydatif généré par l'OTA au niveau rénal et hépatique chez des rats mâles (sprague-dawley).

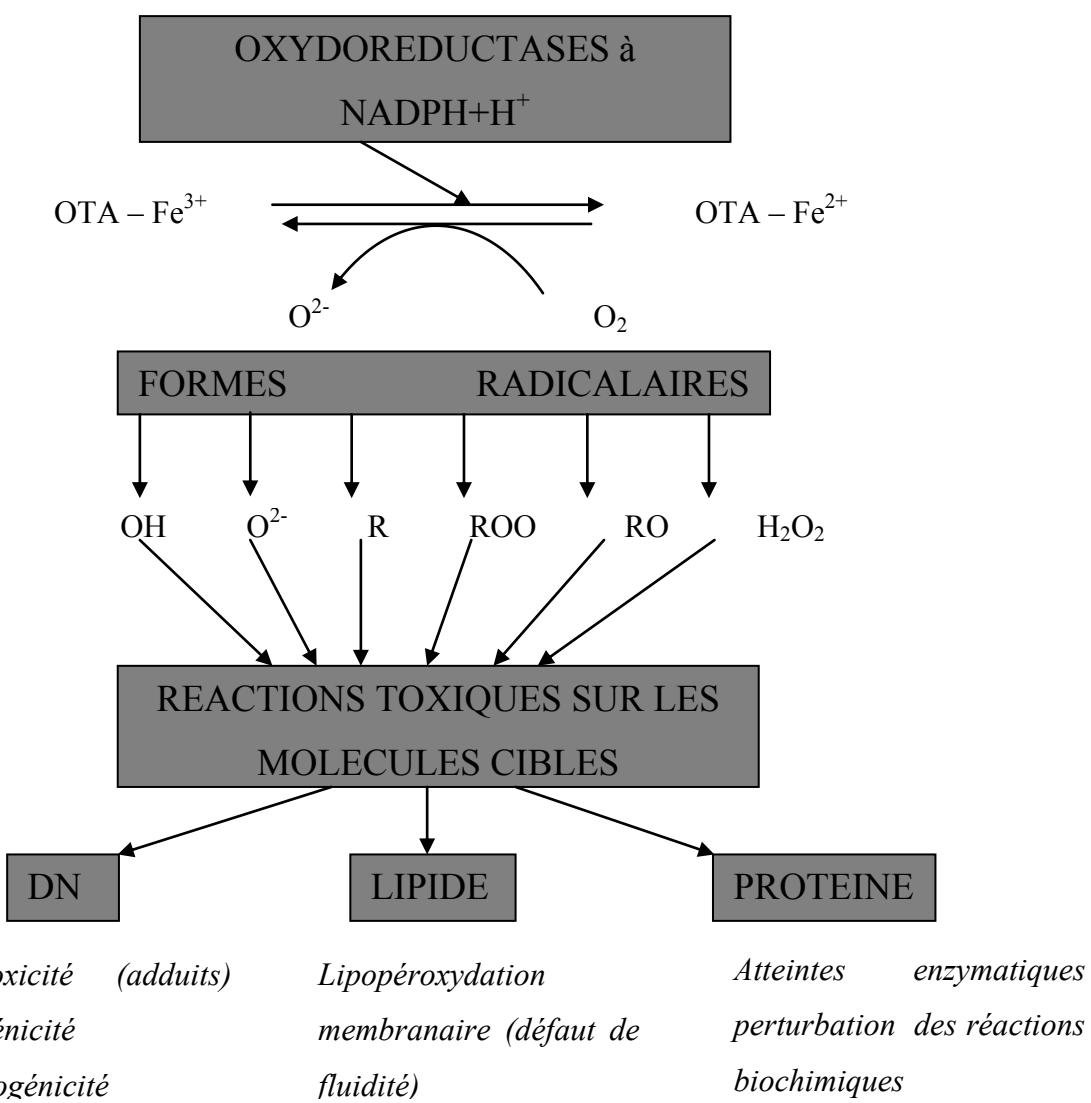


Figure 7 : formation de dérivés radicalaires de l'oxygène et effets toxiques au niveau cellulaire

4.4. Mode d'action au niveau de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est diminuée *in vitro* à la suite d'exposition à l'OTA. Ceci est du à une altération des transporteurs de phosphate de la membrane mitochondriale et à une inhibition de l'activité ATPasique de la membrane interne de la mitochondrie. L'OTA inhibe compétitivement les activités de la succinate déshydrogénase, la succinate cytochrome C réductase et la succinate oxydase mitochondriale de rat (Wei et coll., 1985). Elle inhibe également l'activité de certaines enzymes indispensables aux cycles des acides tri-carboxyliques (cycle de Krebs), induisant une diminution de la production d'ATP.

4.5. Mode d'action au niveau du métabolisme calcique

Les effets toxiques de l'OTA, principalement la néphropathie, sont en partie liés à la mobilisation du calcium intracellulaire (Rahimtula et Chong, 1991).

L'augmentation de la lipopéroxydation induite par l'OTA mène à une modification de l'homéostasie calcique hépatique et rénale, avec une augmentation du taux de calcium cytosolique (Chong et Rahimtula, 1992).

4.6. Interaction avec d'autres mycotoxines

De nombreuses mycotoxines peuvent influencer fortement la toxicité de l'OTA en potentialisant ses effets ; c'est le cas notamment des aflatoxines, de la citrinine, de l'acide pénicillinique. Ces mycotoxines coexistent fréquemment avec l'OTA dans les denrées alimentaires (Braunberg et coll., 1994 ; Creppy et coll., 1980a ; Sansing et coll., 1976). Un phénomène de synergie avec l'OTA peut donc se produire et compliquer l'attribution à la seule OTA de ses effets toxiques (Pohland et coll., 1992)

Chapitre 5. Principaux effets biologiques

5.1. OTA et santé animale

5.1.1. Néphrotoxicité et perturbation de la fonction rénale

En raison de sa capacité de transport actif et de sa fonction de concentration, le rein est exposé à de fortes concentrations de substances toxiques ; il constitue de ce fait une cible privilégiée pour les xénobiotiques tels que l'OTA. La morphologie et la fonction du rein sont fortement affectées par de très fortes doses d'OTA. La néphropathie (effet toxique majeur de l'OTA) se caractérise par une tubulonéphrite interstitielle, une augmentation du volume des reins et du volume de l'urine ; tout ceci évoluant lentement vers une urémie terminale (Krogh et coll., 1974; Petkova et coll., 1988). On note également une polyurie, une glycosurie, une protéinurie et une enzymurie signe d'une atteinte du tube contourné proximal (Kane, 1986).

Cette pathologie a été décrite aussi bien chez les animaux (porc, rat, volaille, souris...) à la suite d'ingestion d'aliment contaminé par l'OTA, que chez l'homme (Elling et Moller, 1974 ; Krogh et coll., 1974 et 1976).

*** Néphropathie chez le rat**

Administré à des rongeurs, l'OTA provoque une néphropathie. Afin de déterminer les mécanismes de la néphrotoxicité, de nombreuses études ont été effectués chez l'animal de laboratoire, notamment le rat (Berndt et Hayes, 1979 ; Kane et coll., 1986a ; Purchase et Theron, 1968). Ainsi, des rats ont été intoxiqués de façon chronique par voie orale (0,4 et 0,8 mg/kg de poids corporel) pendant 3 mois avec des doses de toxine maintenues moyennes ou basses en raison de la longue période de traitement et de son accumulation éventuelle par les organes (rein). Dans ces conditions, le poids corporel des animaux diminue de manière significative, ainsi que le poids relatif et la taille moyenne des reins. Par ailleurs, l'accumulation de la toxine semble affecter essentiellement le rein et à moindre degré, le sang alors que dans l'urine les

quantités d'OTA éliminées restent basses. L'étude histologique des reins montre une dégénérescence du tissu tubulaire révélée par l'apparition de cellules tubulaires anormales caryomégaliques et de mitoses inhabituelles à un stade précoce (après 15 jours), suivie de figures apoptotiques fréquentes (après 3 mois). L'altération de la fonction rénale se traduit également par une augmentation du taux des enzymes urinaires (γ GT, PAL, LDH et NAG). Parallèlement à l'augmentation du taux des enzymes dans l'urine, on constate une diminution de leur taux dans les tubules rénaux (sauf en ce qui concerne le NAG) (Kane et coll., 1986a).

* Néphropathie porcine

La néphropathie porcine a principalement été décrite au Danemark et en Suède, mais également dans d'autres pays européens (Pologne, Hongrie...) (Elling et Moller, 1974 ; Rutqvist et coll., 1978 ; Sandor et coll., 1982). Elle se caractérise, après ingestion de nourriture contaminée, par une tubulonéphrite interstitielle qui se traduit par une dégénérescence suivie d'une atrophie tubulaire puis par une fibrose interstitielle et en conséquence par une altération des fonctions rénales.

Dans les reins des porcs nourris avec une alimentation contenant 0,2 à 1 mg/kg/j d'OTA, soit 0,008 à 0,041 mg/kg/j de poids corporel, on a noté une baisse de l'activité dose-dépendante de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de la γ glutamyl-transpeptidase. L'atteinte primaire porte sur la membrane de la bordure en brosse des tubules rénaux ; les tubules proximaux étant les premières cibles (Elling et Moller, 1974).

La néphropathie porcine a été reproduite chez l'animal de laboratoire par administration aiguë ou chronique de l'OTA. Des porcs auxquels ont été administrées des cultures d'*Aspergillus ochraceus* ou de l'OTA pure (0,2 à 4 mg/kg) développent une néphropathie semblable à celle qui est observée dans les cas de contamination naturelle (Elling et coll., 1985 ; Krogh et coll., 1974,

1976 et 1979). Au bout d'une à trois semaines, on constate chez les animaux traités, une nécrose et une dilatation des tubules contournés proximaux. L'altération de la fonction rénale se caractérise également par une polyurie, une protéinurie, une glycosurie, une urémie et une augmentation des enzymes urinaires. Les analyses histologiques permettent d'observer les altérations de la membrane de la bordure en brosse des cellules des tubules contournés proximaux (Elling et coll., 1985).

L'administration sous-cutanée du superoxyde dismutase et de catalase a entraîné une compensation des effets néphrotoxiques de l'OTA chez ses porcs. Ce qui a permis à l'auteur d'émettre l'hypothèse selon laquelle, les radicaux du superoxyde d'hydrogène seraient vraisemblablement impliqués dans le mécanisme néphrotoxique de l'OTA *in vivo*.

* Néphropathie chez la volaille

Chez le poulet, des lésions rénales associées à l'ingestion de l'OTA ont été observés (Elling et coll., 1975). Les lésions structurales se caractérisent par une dilatation des tubules rénaux, une déformation des cellules épithéliales et une fibrose interstitielle. On note également une néphrite aiguë avec gonflement des cellules épithéliales tubulaires et dépôts de protéines dans la partie lumineuse.

Chez des animaux auxquels a été administrée pendant un an, une dose de 0,3 à 1 mg/kg, les lésions histologiques fonctionnelles induites sont identiques à celles qui sont observées dans le cas des contaminations naturelles (altération des tubules rénaux ainsi que la fonction de filtration glomérulaire).

L'OTA provoque aussi chez le caneton une hypertrophie des reins et du foie. On observe également une vacuolisation du cytoplasme ainsi qu'une désorganisation du réticulum endoplasmique du foie.

5.1.2. Effets sur la coagulation

L'OTA perturbe le processus de l'hémostase (plaquettes et certains facteurs de la coagulation) (Pohland et coll., 1992) ; cet effet serait lié à la structure isocoumarinique de la toxine.

5.1.3. Immunotoxicité

L'OTA affecte à la fois la réponse à médiation cellulaire et humorale. En effet, Lea et coll (1989) ont montré dans une étude *in vitro* que l'OTA inhibe la prolifération des lymphocytes périphériques T et B, qu'elle abolit la production d'interleukine 2 (IL2) ainsi que de ses récepteurs. L'OTA supprime l'activité de cellules tueuses ainsi que la production d'interféron (Luster et coll., 1987).

Cet effet immunosuppresseur est une dose dépendante mais la dose reste toutefois inférieure à celle qui provoque la néphropathie. L'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et de la réponse immunitaire. Elle peut être à l'origine de lymphopénie, de régression du thymus et de suppression de la réponse immunitaire.

L'administration au porc d'une dose d'OTA de 0,06 mg/kg entraîne une inhibition de 10% de la réponse immunitaire dans les conditions normales d'élevage (Hult et coll., 1980 et 1984). Cependant, si on administre à ces porcs une dose plus élevée de 2,5 mg d'OTA/kg, on constate une diminution de l'activité phagocytaire des macrophages et la production d'interleukine 2 (IL2) (Harvey et coll., 1992 ; Léa et coll., 1989).

Une administration de 5 µg d'OTA/kg en dose unique par voie intrapéritonéale chez la souris Balb/c supprime la réponse immunitaire (IgG, IgM). Avec de fortes doses (20 à 80 mg/kg en intrapéritonéale, 1 jour sur 2 pendant 8 jours) chez les souris Swiss, on note un appauvrissement cellulaire important de la moelle osseuse avec une diminution de la masse thymique (de l'ordre de 33 %) et baisse de la capacité phagocytaire et inhibition de la croissance tumorale (Boorman et coll., 1984).

Chez les cobayes ayant reçu de l'OTA à 5,6 mg/kg de poids corporel, on observe une nécrose et des oedèmes des ganglions lymphatiques, de la rate et du thymus ainsi qu'une leucopénie (Hagelberg et coll., 1989).

Chez le poulet recevant de la nourriture contaminée par 0,5 à 2 mg d'OTA /kg pendant 21 jours, il a été observé une immunosuppression. L'effet immunosuppressif de l'OTA n'est pas sélectif et plusieurs réactions immunitaires peuvent être directement ou indirectement affectées.

Parallèlement aux études *in vivo*, de nombreuses expérimentations ont été réalisées *in vitro*, sur les lymphocytes en culture. Dans ces cellules, l'OTA inhibe la synthèse protéique (70% d'inhibition pour des doses d'OTA de 1 μ g/ml) (Creppy et coll., 1982b).

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour indique que l'immunosuppression serait principalement due à l'inhibition de la synthèse des macromolécules dans les cellules lymphocytaires (Stormer et Léa, 1995). Le système immunitaire semble donc être une cible très sensible à l'action de l'OTA. Le métabolite hydroxylé de l'OTA, le 4R.OH-OTA s'est révélé aussi immunosuppresseur que l'OTA (Creppy et coll., 1983a).

5.1.4. Neurotoxicité

Les effets neurotoxiques de l'OTA se manifestent au niveau de toutes les structures du système nerveux central. Bruinink et coll (1997), ont monté que l'OTA était hautement毒ique pour les cellules nerveuses. L'OTA atteint le tissu neuronal (cerveau, rétine).

Après administration par voie intracérébrale, l'OTA a été détecté 24 heures plus tard dans toutes les régions du système nerveux central, à l'exception des organes et liquides périphériques (sang, rein, urine...) ; ce qui indique que le passage de l'OTA du fluide cérébral vers les liquides biologiques que sont le sang et les urines est nul ou presque inexistant. Les principaux organes cibles

sont l'hippocampe, le mésencéphale ventral, le striatum et le cervelet (Berndt et Hayes, 1979).

Une contamination par suite d'alimentation provoque une accumulation de l'OTA dans le cerveau. L'accumulation est proportionnelle à la dose et au temps d'exposition et peut atteindre au bout de 6 semaines 100 ng/g de cerveau (Berndt et Hayes, 1979). L'atteinte cérébrale se caractérise également, hormis les lésions, par une réduction du taux de tyrosine, des acides aminés et du phénanthrène (Berndt et Hayes, 1979). L'activité de certaines enzymes du système nerveux central est aussi modifiée par l'OTA. C'est le cas notamment de la γ glutamyltransferase pour laquelle on note une augmentation considérable de l'activité dans certaines régions du cerveau. Quant aux autres enzymes, les modifications de l'activité étaient sélectives régionalement avec un retour à la normale au bout des 35 jours d'exposition (Roth et coll., 1988).

De nombreuses études expérimentales sur la neurotoxicité de l'OTA chez le rat ont été réalisées *in vivo*, notamment sur des cultures cellulaires provenant de neurones. Ces études ont établi clairement que la neurotoxicité de l'OTA était due à sa partie isocoumarinique (Bunge et coll., 1979).

5.1.5. Tératogénicité

L'OTA est tératogène chez l'animal. Elle traverse la barrière foeto-placentaire, ce qui explique les malformations du squelette notamment les malformations vertébrales observées chez le fœtus animal (rat, chien, souris, poulet, porc...) ; de telles malformations n'ont pas été mises en évidence chez l'homme (Arora et Frölen, 1981 ; Brown et coll., 1976 ; Hayes et coll., 1974 ; Mayura et coll., 1982).

L'administration d'OTA par voie intrapéritonéale (dose totale de 4 mg/kg) ou par voie orale (dose totale de 5 mg/kg) à des rates gestantes occasionne une perte de poids des fœtus ainsi qu'une proportion anormale de fœtus présentant des hémorragies. De plus, des administrations orales répétées d'OTA (0,75

mg/kg de poids) du 6^{ème} au 15^{ème} jour sont embryotoxiques et tératogènes. Elles induisent, chez les petits, des anomalies des viscères et du squelette (Brown et coll., 1976). On observe également des retards psychomoteurs et des modifications du comportement (Poppe et coll., 1983).

De même, l'administration par voie intrapéritonéale d'une dose unique de 5 mg/kg d'OTA à des souris gravides conduit à des malformations fœtales, voire à la mort in utero. Les effets les plus fréquents sont une encéphalite, des anomalies oculaires, des doigts et de la queue (Hayes et coll., 1974). L'OTA provoque aussi une nécrose des cellules cérébrales et une microcéphalie (Fukui et coll., 1987a).

Des anomalies touchant les membres, le cou, les viscères et la taille ont été notées chez les embryons de poulet après l'injection d'OTA dans la poche d'air d'œufs fertilisés à une dose réduite de 5 µg par œuf (Giliani et coll., 1978). La fréquence, la multiplicité et la sévérité de ces anomalies augmentent avec la dose.

Outre les anomalies de structures, l'OTA provoquerait des modifications neurochimiques. On constate en effet chez les fœtus, une diminution des taux de DNA, de RNA, de protéines et de monoamines telles que la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine (Fukui et coll., 1992).

Des modifications histologiques ont été également décrites, notamment une augmentation du nombre des neurones, ainsi qu'une réduction du diamètre des noyaux.

Le mécanisme de tératogénicité semble être lié à une action directe de l'OTA sur le développement embryonnaire et à un effet indirect de l'OTA par action sur la mère (Arora et Frölen, 1981). En effet, il a été démontré que l'OTA administrée à la ratte passe le placenta et s'accumule dans les tissus fœtaux d'où son effet direct sur l'embryon (Ballinger et coll., 1986).

5.1.6. Génotoxicité et mutagénicité

L'évaluation de la génotoxicité d'un xénobiotique peut être effectuée à l'aide de différents tests, tel que la mesure de la mutagénicité par le test d'AMES, la mesure d'échange de chromatines sœurs, la détection des cassures simple-brin du DNA, la formation de micro noyaux, etc. (Ashby et coll., 1988).

Face à des résultats contradictoires, l'OTA a longtemps été considérée comme non génotoxique. Les différents tests de la mutagénicité effectués sur les procaryotes se sont révélés négatifs (test d'AMES réalisé sur différentes souches de *Salmonella typhimurium*) (Von Engel et Von Milezewski, 1976). Par la suite, une activité mutagène a été observée sur des souches de *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1538, TA 100 exposées au surnageant d'hépatocytes de rats traités *in vitro* par l'OTA métabolisée (Hennig et coll., 1991). Il a été constaté également une induction d'échange de chromatides sœurs dans des lymphocytes humains cultivés dans un milieu contenant l'OTA métabolisé par ces mêmes hépatocytes.

La génotoxicité de l'OTA a été démontrée en utilisant d'autres types de cellules mammifères. D'une part il a été observé, une désorganisation de la synthèse d'ADN dans les hépatocytes de rats ACI et de souris C3H, en culture, par modification de la réparation (Mori et coll., 1984). D'autre part, l'OTA provoque une légère augmentation de la réponse au chromotest-SOS, sans relation dose-effet ainsi qu'au spot test-SOS (Auffray et Boutibonnes, 1986). La toxine a provoqué un effet mutagène direct sur la souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) PQ 37. L'étude de l'induction d'*E. Coli* PQ 37, a montré que l'OTA induit une réponse SOS en absence d'activateur exogène (Malaveille et coll., 1991).

Les effets génotoxiques de l'OTA sont démontrés *in vivo* par des cassures simple-brin du DNA, des adduits au DNA, des aberrations chromosomiques.

5.2. OTA et santé humaine

L'exposition de l'homme à L'OTA s'effectue par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire de façon directe (consommation de céréales, oléagineux etc....contaminés) ou indirecte (consommation de viande, de lait etc....contaminés) et également par inhalation de moisissures (Di Paolo et coll., 1993 et 1994). L'OTA résiste aux traitements culinaires ordinaires et peut avoir une longue durée de demi-vie chez les humains. Les premières études pour relier la néphropathie endémique des Balkans (BEN) à l'exposition de l'homme à l'OTA par mesure des teneurs en cette mycotoxine dans le sang ont débuté en ex -Yugoslavie. Dès 1982, Hult et coll. constatent que 7 % d'échantillons de sang humain sont contaminés par de l'OTA à des taux supérieurs à 1 ng/ml et peuvent atteindre 40 ng/ml (Hult et coll., 1982 ; Petkova et coll., 1988). Ces résultats suggèrent une corrélation entre l'exposition à l'OTA, l'incidence du BEN et le cancer du tractus urinaire. Depuis le début des années 80, l'OTA a été décelé dans le sang humain. (Tableau V)

L'ensemble des travaux effectués a permis de constater que l'ochratoxicose humaine concerne non seulement les pays du Balkans mais aussi tous les pays du monde et que la fréquence des personnes OTA- positives est liée à divers facteurs tels que les zones géographiques, les saisons etc.... ; il semble par exemple que les zones rurales soient plus touchées que les zones urbaines (Creppy et coll., 1991 et 1993).

Tableau V : teneur en OTA dans le sang et le lait chez l'homme

Echantillons biologiques	Taux de contamination	Pays	Références
Sérum	2 – 10 ng/ml	Péninsule Balkanique	-Hult et coll, 1982a, b -Petkova-Bocharova et Castegnaro, 1985 -Petkova-Bocharova et coll., 1988
Serum Rein Lait	0,1 – 14,4 ng/ml 0,1 – 0,3 ng/g 24ng/l	Allemagne	Bauer et Gareis, 1987
Serum	0,1 – 13,2 ng/ml	Danemark	Hald, 1991
Serum Lait maternel	0,44 ng/ml 0,1 – 12 pg/ml	Italie	-Breithotz-Emanuelson et coll, 1994 -Miraglia et coll., 1993
Serum Lait	0,06 – 6,02 ng/ml 5 – 14 pg/ml	Suisse Suisse	Zimmerli et Dick, 1995
Serum	0,27 ng/ml	Pologne	Golinski et coll., 1991
Serum	0,1 – 4,3 ng/ml 0,1 – 11,8 ng/ml 0,1 – 8,4 ng/ml	Rhone-Alpes Alsace Aquitaine	Creppy et coll., 1993
Lait	0,2 – 337 ng/ml	Sierra Leone	Jonsyn et coll., 1985
serum	0,01 – 5,81 ng /ml	Côte d'Ivoire	Sangaré et al. , 2006

a. Néphropathie aiguë chez l'homme

Une néphropathie aiguë paraît exceptionnelle. La seule observation disponible semble être celle décrite par Di Paolo et Coll. (1993) concernant le cas d'insuffisance rénale aiguë chez des fermiers travaillant pendant 8 heures dans une grange à blé qui était restée close pendant deux années. L'inhalation de la mycotoxine conduira au bout de 5 jours à une insuffisance rénale aiguë à diurèse conservée (créatinine sanguin 64 mg/l, clairance de la créatine 9 ml/mn). La protéinurie est importante (4,6 g/l) avec hypoprotidémie. La taille des reins est à la limite supérieure à la normale. Le diagnostic retenu est celui de nécrose tubulaire aiguë avec présence de lésion glomérulaire minime. Des expériences similaires ont été effectuées sur des lapins avec du blé contaminé et l'on a constaté les mêmes effets. Cette observation est la seule précisant chez l'homme une possible atteinte rénale survenant après inhalation de mycotoxine.

b. Néphropathie endémique des Balkans (NEB)

L'observation la plus actuelle, quant à la responsabilité de l'OTA dans la survenue de néphropathie chronique est celle décrite dans les Balkans entre 1953 et 1956 (Austwick, 1981). Il s'agit d'une néphropathie tubulo-interstitielle bilatérale d'étiologie inconnue. Le tableau clinique consiste en une lente dégénérescence rénale avec une protéinurie, une urémie, une atrophie de l'épithélium tubulaire, une fibrose interstitielle du cortex rénal, une hyalinisation des glomérules et à long terme, des tumeurs du tractus urinaire (Castegnaro et coll., 1987 ; Hult et coll., 1982 ; Krogh et coll., 1974 ; Petkova et coll., 1988). Des études épidémiologiques ont montré une prévalence de cette maladie en Bulgarie, en Roumanie, en Croatie, en Bosnie et en Serbie.

Il y a quelques années, l'implication de l'OTA dans la survenue de la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) n'était encore qu'à l'état d'hypothèse. Depuis les années 90, un élément nouveau est venu renforcer l'hypothèse de cette implication.

En effet, Pfohl Leszkowicz et Coll. (1993c) ont montré la ressemblance entre les adduits au DNA obtenus expérimentalement chez des souris intoxiquées par l'OTA et les adduits trouvés dans les biopsies de reins et de vessies provenant des patients atteints de la néphropathie endémique des Balkans (NEB).

c. Néphropathie interstitielle chronique d'Afrique du Nord

La néphropathie humaine a été également décrite en Afrique du nord sous le vocable de néphropathie interstitielle chronique d'Afrique du nord. Cette néphropathie varie selon les régions.

En effet, il existe dans les pays d'Afrique du nord, des foyers à forte prévalence d'insuffisance rénale chronique. Ainsi, dans le centre de la Tunisie, l'incidence de l'insuffisance rénale a été évaluée à 150 nouveaux cas par million d'habitants. Dans cette région, les néphropathies interstitielles chroniques représentent 30 à 35% des causes d'insuffisances rénales chroniques terminales, dont le 1/3 d'origine indéterminée (Krogh, 1987).

La contamination de la population tunisienne par l'OTA est fréquente. On estime à 65% de la population générale, le nombre de sujets contaminés avec des taux sériques allant de 0,7 à 7,8 ng/ml. Ce taux est 8 à 10 fois plus élevé chez 64% des patients ayant une insuffisance rénale chronique avec une présence d'OTA dans le sang à un seuil de détection de 1 ng/ml.

Les plus hautes valeurs de l'OTA (25 à 50 ng/ml) sont retrouvées chez les patients qui ont une néphropathie interstitielle chronique, alors que les taux sont 3 à 4 fois moins élevés chez les patients ayant une glomérulonéphrite chronique ou une néphropathie vasculaire (Krogh, 1987). Ce travail a été enrichi par une étude démontrant que les patients ayant une néphropathie interstitielle chronique et des taux sériques d'OTA les plus élevés ont également la contamination alimentaire la plus importante. Ainsi, il semble aujourd'hui probable que l'OTA soit un facteur impliqué dans la survenue ou l'aggravation des néphropathies interstitielles chroniques en Tunisie, ainsi que dans d'autres pays du Maghreb.

d. En Côte d'Ivoire

Les études préliminaires portant sur l'OTA contenue dans le sang menées entre 1998 et 2004 par Sangaré *et al.* (2006c) 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 5,81 µg/l pour une teneur moyenne de 0,83 µg/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 1,05 µg/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., 2006c)

Catégorie de personne	effectif	Pourcentage de contamination	Etendue µg/l	Moyenne en µg/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

Chapitre 6. Détection et Dosage de l'OTA

Il existe diverses méthodes d'analyse de l'ochratoxine A (Van Egmond, 1991). Ces méthodes impliquent toutes au préalable, une extraction par des solvants organiques appropriés, suivie d'une purification et du dosage.

Un certains nombre de techniques ont été proposés pour la détermination de l'OTA.

6.1. Dosage de l'OTA par chromatographie sur couche mince (CCM)

La technique de chromatographie sur couche mince, mise au point par Nesheim (1973), a été adoptée officiellement par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemist) pour l'analyse en phase normale de l'OTA, l'OTB et leurs esters. La détection et la quantification de la mycotoxine peuvent se réaliser sous lampe UV ou mieux par fluorescence. Elle fut d'abord utilisée pour la détermination de l'OTA dans le café vert et l'orge puis étendue par la suite avec succès à diverses céréales et produits biologiques (Bartos et Matyas, 1980; IARC, 1982).

Sa limite de détection est de 10 ng/g dans le cas des céréales et d'environ 0,2 à 0,5 ng/g dans le cas des tissus animaux (Paulsch et coll., 1982).

6.2. Dosage de l'OTA par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les méthodes HPLC, développées par Bauer et Gareis (1987), Nesheim (1973), Nesheim et coll (1992) pour les dosages de l'OTA dans les céréales, les produits animaux (tissus et sérum) ou le sérum humain ont un seuil de détection de l'ordre de 0,1 ng/g ou 0,1 ng/ml.

La première méthode CLHP pour la détermination de l'OTA dans le maïs et l'orge a été validée dans une étude internationale conduite par 16 laboratoires.

Les taux de contamination observée étaient de 10 à 50 ng/g. L'OTA est extraite par un mélange chloroforme/acide phosphorique aqueux suivi d'une dilution dans une solution de bicarbonate aqueuse préalablement purifiée sur une colonne C18 (extraction en phase solide). L'identification et la quantification ont été effectuées par CLHP en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique. La présence de l'OTA dans les échantillons a été confirmée par dérivation à l'aide d'ester méthylique suivie de l'analyse chromatographique (Nesheim *et al.*, 1992).

Cette première méthode dont le seuil de détection était de 1 µg/kg de maïs ou d'orge a été adoptée par l'AOAC comme méthode officielle pour le dosage de l'OTA. Elle a ensuite été validée pour les autres céréales.

Le comité Européen de standardisation (CEN, Comité 275/WG5 technique « biotoxines ») qui utilise des critères spécifiques pour sélectionner des méthodes a adopté cette première méthode comme standard CEN (EN ISO 15141-2) pour la détermination de l'ochratoxine A dans l'orge, le maïs et le son de blé.

La deuxième méthode CLHP, adoptée comme standard CEN (EN ISO 15141-1) pour la détermination de l'OTA dans les céréales et les produits céréaliers, a été validée dans une étude internationale sur le blé contenant de l'OTA dans les proportions de 0,4 à 1,2 µg/kg. L'OTA est extraite avec du toluène après ajout d'acide chlorhydrique et une solution de chlorure de magnésium suivie d'une purification sur colonne de silice. La quantification s'est faite par CLHP en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique. Cette méthode est aussi applicable aux céréales, fruits secs, oléagineux, vin, bière, jus de fruit et café vert.

Ces deux premières méthodes ont largement contribué à la quantification de l'OTA dans les denrées alimentaires. Depuis quelques années, l'usage des colonnes d'immuno-affinité contenant les anticorps anti-OTA dans la purification a considérablement amélioré l'analyse de l'ochratoxine A.

Deux méthodes basées sur la purification sur colonne d'immuno-affinité pour la détermination de l'OTA dans l'orge et dans le café torréfié ont été développées et validées dans une étude internationale conduite par l'Union Européenne (Entwistle A., 2000).

L'OTA est extraite de l'orge avec l'acétonitrile. Après filtration, on procède à une dilution avec du tampon phosphate suivie d'une purification sur une colonne d'immuno-affinité ; dans le cas du café torréfié, une pré-purification a lieu sur colonne de phenylsilane afin d'éviter tout effet nuisible de la caféine sur les colonnes d'immuno-affinité (Entwistle A., 2000). Dans ces deux cas, l'extrait est analysé par CLHP en phase inverse couplée à un détecteur fluorimétrique.

La présence de l'OTA dans le vin a été rapportée pour la première fois par Zimmerli et Dick (1995). La méthode analytique utilisée est identique à la précédente, mais l'extraction s'est faite avec du chloroforme. Une méthode plus exacte et précise a été par la suite développée pour le dosage de l'OTA dans le vin rouge, le vin rosé, le vin blanc et la bière. Avant l'étape de purification sur colonne d'immuno-affinité, on procède à une simple dilution de l'échantillon avec un mélange d'eau, de polyéthylène glycol ou de bicarbonate de sodium. La quantification se fait par CLHP.

6.3. Méthode enzymatique de confirmation

Les méthodes spectrofluorimétriques peuvent être utilisées pour le dosage des échantillons biologiques liquides. L'une de ces méthodes décrite par Hult et Gatenbeck (1976), consiste à scinder par la carboxypeptidase, l'OTA en OT α et en phénylalanine. La détection est basée sur la différence entre les spectres d'excitation et d'émission de l'OTA et de l'OT α , ainsi que sur la disparition de l'OTA parallèlement à l'apparition de l'OT α avec un temps de rétention très faible.

6.4. Méthodes de couplage avec la spectrométrie de masse

Le couplage HPLC-Spectrométrie de masse (HPLC-MS) a été utilisé par

Abramson (1987) pour la détection de l'OTA dans l'orge (seuil de détection de l'ordre de 0,5 ng/g).

Récemment, le couplage chromatographique en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CPG-MS) a été mis au point pour détecter la présence d'OTA dans l'alimentation (Jiao et coll., 1992).

6.5. Méthodes immunologiques

Des méthodes immunologiques et radio-immunologiques plus sensibles (test ELISA, RIA, radio immunologie en phase solide) sont également utilisées pour détecter la présence d'OTA dans les céréales, les échantillons biologiques etc... (Candlish et coll., 1988; Morgan et coll., 1985; Rousseau et coll., 1987).

Chapitre 7. Moyens de prévention de l'OTA

7.1. Détoxification de l'OTA

Elle concerne les moyens pouvant être utilisés pour empêcher une moisissure toxinogène de produire l'OTA et/ou de la détruire lorsqu'elle est déjà produite aussi bien en milieu liquide que solide.

7.1.1. Traitements physiques

a. Effet des expositions aux UV

L'utilisation des UV semble être un moyen efficace pour réduire la production d'OTA dans les milieux liquides, mais cela n'a pas été testé sur des inocula solides à cause des difficultés techniques liées à l'exposition des grains.

Ainsi, l'exposition des inocula d'*Aspergillus ochraceus* à l'UV induit une réduction significative du nombre d'amas mycéliens.

b. Effets de l'irradiation par les rayons gamma sur la production d'ochratoxine A en milieu liquide et solide

Les radiations ionisantes doivent être appliquées en quantités suffisantes pour être efficaces. En milieu liquide, si on applique 2 ou 3 kGy, la réduction de la masse mycélienne est faible mais la production d'OTA est fortement augmentée. Il faut aller jusqu'à 4 kGy pour obtenir une réduction de 60% de la production d'OTA, alors qu'à 5kGy il n'y a plus du tout d'OTA produite. Cependant, lorsque les radiations ionisantes sont appliquées à des liquides contenant déjà de l'OTA, la toxine est détruite à 50% environ entre 2 et 3 kGy, et à 80% entre 4 et 5 kGy pour les concentrations élevées d'OTA. Ainsi plus la concentration d'OTA est élevée dans le milieu plus l'irradiation est efficace.

Par contre en milieu solide, l'effet est déjà très net dès 2 kGy où il y a environ 75% de réduction de la quantité d'OTA produite. Mais cet effet n'évolue pas en fonction de la quantité de radiations ionisantes.

c. Effet de la congélation sur la production d'OTA

Lorsque les inocula sont congelés à -20°C, puis décongelés de façon repétée, la masse mycélienne totale est réduite de façon significative alors que la production d'OTA n'est réduite que de 10 à 45 %. Ceci pourrait être le résultat de lésions induites par les cristaux de glace qui se forment pendant la congélation lente. L'effet de cette congélation n'est pas proportionnel à la durée ni au nombre de congélations-décongélations. Ce procédé de congélation devra être mis au point en fonction de paramètres tels que le temps de congélation ou de décongélation, de la nature et de degré d'humidité de la denrée concernée.

Quant aux congélations dans de l'azote liquide suivies de décongélations, aucun effet n'est observé.

d. Effet de la chaleur sur la production d'OTA

L'impact de la chaleur sur la teneur en OTA dans les aliments a été largement étudié (Chu et coll., 1975; Fuchs et coll., 1988b; Harwig et coll., 1974; Trenk et coll., 1991). Un autoclavage à 150°C ne réduit que de 20% les taux d'OTA dans l'alimentation humaine ; même si la durée est de 3 heures à 200°C, la toxine n'est pas complètement détruite. La chaleur n'a pas d'influence significative sur cette toxine. Cela s'explique par le fait que l'OTA est un composé très stable.

7.1.2. Traitements chimiques

Les méthodes utilisées pour la détoxification des céréales sont essentiellement basées sur des traitements par l'ammoniac.

Chelkowski et coll (1982) ont montré qu'un traitement de grains de maïs par une solution d'ammoniaque à 2% réduisait considérablement les taux d'OTA et

décomposait la toxine en composés moins toxiques. Ce traitement s'avère préjudiciable à la qualité des protéines du maïs.

L'utilisation d'hypochlorite dans le cadre du stockage des grains, réduit également les taux d'OTA.

7.1.3. Combinaison de traitements chimique et physique

➤ Un procédé de détoxification a été mis au point par Madsen et coll (1983). Il consiste en un traitement de l'orge par l'ammoniaque (5%) pendant 96 heures à 70°C, suivi d'un chauffage à 90°C avec de la soude (0,5%), puis d'un autoclavage à 132°C pendant 30 minutes. Ce procédé qui ne réduit que de 16 % le taux d'OTA, peut altérer la qualité nutritive des protéines.

L'utilisation d'alcali (ammoniaque 5% + soude 0,5%) associée à un traitement thermique a pour effet l'ouverture du cycle lactone. Cependant, bien que le taux d'OTA soit réduit dans l'orge traité, on retrouve sensiblement la même quantité de toxine dans les reins des animaux, ce qui laisse supposer que le cycle lactone se refermerait au contact du pH acide de l'estomac.

➤ Il est également possible de détoxifier l'OTA prétraitée ou non avec H₂O₂ (0,05 à 10%), par chauffage à 100°C en présence de NaOH 0,1 ; l'OTA serait probablement hydrolysée en Ota et en phenylalanine selon une réaction semblable à celle de la carboxypeptidase. Cependant pour obtenir une complète détoxification, de forts pH sont nécessaires (pH 10 – 12) (Trivedi et coll., 1992).

➤ Par contre un traitement acide (HCL 0,1 N) à forte température (T° < 100°C) ne suffit pas à détoxifier complètement la toxine (dégradation très lente) (Trivedi et coll., 1992).

7.1.4. Traitements enzymatiques

a. Effets de la carboxypeptidase sur la production de l'OTA

La carboxypeptidase, enzyme pancréatique qui hydrolyse l'OTA en Ota et phénylalanine, entraîne une réduction très nette de la quantité d'OTA

produite, environ 60% après 18 jours pour 40 U/I, et une disparition complète de l'OTA pour 100 U/I (Deberghes et coll., 1995). Cependant, la masse mycélienne totale humide ou sèche, n'est pas réduite par la présence de la carboxypeptidase indiquant qu'elle agit plutôt sur l'OTA déjà formée et pas sur son processus de formation.

b. Action de l'uricase

Les résultats de Deberghes et coll (1995) mettent en évidence l'efficacité de l'uricase en ce qui concerne la production d'OTA. Cette enzyme utilise la toxine comme substrat et la transforme en une ou plusieurs entités qu'il conviendrait d'identifier pour en apprécier l'éventuelle toxicité.

c. Influence de la superoxyde dismutase associée à la catalase sur la néphrotoxicité induite par l'OTA chez le rat

- La superoxyde dismutase (SOD) et la catalase atténuent l'augmentation de l'enzymurie et de la protéinurie provoquée par l'OTA. Ces deux enzymes semblent donc prévenir, en grande partie, les lésions oxydatives induites par l'OTA.
- Les traitements par la SOD et la catalase atténuent significativement l'augmentation de la créatininémie observée chez les rats traités par l'OTA, et augmentent par contre, la créatininurie. La clairance de la créatinine diminue significativement après traitement par la SOD et la catalase.
- La SOD et la catalase agissent en inhibant le processus oxydatif (diminution de la peroxydation lipidique) avec pour conséquence, l'augmentation de l'excrétion et de l'élimination de l'OTA. Nous pouvons donc conclure que ces molécules semblent prévenir , en grande partie, la néphropathie induite par l'OTA. Elles pourraient par

conséquent, être utilisées en tant qu'agents protecteurs contre les effets de l'ochratoxicose humaine.

7.2. Prevention des effets de l'OTA par l'emploi de molécules protectrices

De nombreux travaux montrent qu'il est possible de limiter la toxicité de l'OTA par l'emploi de molécules protectrices. Ainsi, la phénylalanine (anologue structurale de l'OTA), les vitamines A, C et E, la cholestyramine ou le bicarbonate de sodium, ont été employées dans diverses études pour réduire ou inhiber certains effets biologiques de l'OTA.

7.2.1. Effets protecteurs de la phénylalanine

a. Effets antidotiques sur l'inhibition de la synthèse protéique

Etant donné que l'OTA agit comme un inhibiteur compétitif de la phénylalanine, Creppy et Coll. (1979b) ont étudié en présence de l'OTA, les effets de cet acide aminé sur la croissance cellulaire ainsi que sur la synthèse protéique. Dans les cellules d'hépatome en culture (MTT), l'addition simultanée de 150 µM de phénylalanine et de 90 µM d'OTA permet d'empêcher totalement la croissance cellulaire induite par la toxine. Il en est de même en ce qui concerne l'inhibition de la synthèse protéique qui est levée en présence de cette addition.

Lorsque la phénylalanine est ajoutée 1 à 2 heures après l'incorporation de la toxine, on constate une réversion de l'action de l'OTA après un temps de latence de 2 heures.

Dans les cellules MDCK, l'OTA inhibe à la fois la synthèse des macromolécules et les activités enzymatiques. La protection par 100 µM de phénylalanine est optimale quand ces cellules sont prétraitées 4 heures avant l'intoxication par l'OTA (Creppy et coll., 1986).

b. Effets de la phénylalanine sur la toxicité aiguë chez l'animal

Chez des souris Balb/C, traitées en intrapéritonéale par 0,8 mg d'OTA, on constate en 24 heures 100 % de mortalité. Par contre, lorsque cette dose est injectée en même temps que 0,8 mg de phénylalanine, 97% des animaux survivent ; avec 1 mg de phénylalanine, le pourcentage de survie atteint 100 % (Creppy et coll., 1984). Mais lorsque la phénylalanine est injectée 1 heure après l'administration de l'OTA, seulement 10 % des souris survivent.

On ne retrouve donc pas chez l'animal la réversion observée *in vitro* avec les cellules HTC, lorsque l'acide animé est administré une heure après l'intoxication par la toxine. Ainsi, la phénylalanine peut prévenir une intoxication aiguë mortelle induite par l'OTA (Creppy et coll., 1984).

c. Effets de la phénylalanine sur l'immunosuppression

Chez la souris Balb/C, une administration intrapéritonéale de 1 μ g/kg d'OTA, suffit à supprimer 70% de la réponse immunitaire (IgM, IgG). Cet effet est prévenu lorsque l'on administre en même temps que la toxine, une dose de phénylalanine 10 fois supérieure (10 μ g /kg) (Creppy et coll., 1983b ; Haubeck et coll., 1981).

d. Prévention partielle de la tératogénicité

L'administration simultanée de phénylalanine et de l'OTA à des rates en gestation, induit chez celles-ci une réduction des effets tératogènes.

Ainsi, l'administration simultanée à des rates gravides au 7^{ème} jour de gestation de 20 mg/kg de phénylalanine et de 1,75 mg/kg d'OTA, se traduit par une diminution significative des malformations du squelette telles que celles qui se manifestent chez des fœtus issus d'une rate traitée uniquement par l'OTA (Mayura et coll., 1982).

e. Prévention partielle de la néphrotoxicité

Chez des rats traités par gavage pendant 4 semaines avec 145 µg d'OTA/jour, on constate une augmentation des activités enzymatiques dans les urines et une diminution du taux des enzymes dans les tubules.

Ces effets sont relativement atténués lorsque les animaux sont traités simultanément avec de la phénylalanine (1,45 mg/kg/j) et avec l'OTA (145 µg/kg/j) (Kane et coll., 1986a).

f. Influence de la phénylalanine sur la toxicocinétique de l'OTA

L'administration simultanée de la phénylalanine et de l'OTA modifie complètement le profil pharmacocinétique de la toxine (Kane, 1986 ; Roth et coll., 1988).

On constate en effet :

- Une augmentation de l'absorption stomachale et intestinale de la toxine ;
- Une modification de la distribution au niveau de différents organes et fluides biologiques (estomac, contenu intestinal, tissus etc....) ;
- Une amélioration du transit gastro-intestinal, avec une augmentation d'OTA dans l'intestin, ce qui favorise le processus de détoxification en Ota par la microflore.
- Une forte atténuation du cycle entérohépatique (réduction de la demi-vie plasmatique). Cette atténuation serait probablement le résultat d'une compétition entre l'OTA et la phénylalanine au niveau de la réabsorption intestinale ;
- Une augmentation des éliminations urinaires et biliaires ; cette augmentation serait la conséquence du déplacement par la phénylalanine de la toxine de ses liaisons avec l'albumine (complexe OTA-protéine), ce qui favoriserait son élimination urinaire.

En conclusion, la phénylalanine administrée préventivement ou peu de temps après l'ingestion d'OTA, peut prévenir en partie voire entièrement un certain nombre d'effets toxiques y compris la néphrotoxicité. Par contre, l'administration per os n'a aucun effet sur la génotoxicité (Kane, 1986).

7.2.2. Effets de la vitamine A sur la génotoxicité induite par l'ochratoxine A

Les effets génotoxiques de l'OTA se traduisent au niveau des reins et d'autres organes par la formation des adduits au DNA, des cassures mono-brins et souvent des aberrations chromosomiques. Ces adduits seraient dus aux radicaux électrophiles générés au niveau du foie après métabolisation de l'OTA. L'administration simultanée de rétinol et d'OTA (à une dose double de la dose thérapeutique usuelle) réduit de façon significative chez la souris, les effets génotoxiques induits par l'OTA (Kumari et Sinha, 1994).

7.2.3. Effets de la vitamine C sur la génotoxicité de l'OTA

La vitamine C diminue la génotoxicité de l'OTA, une grande partie des adduits disparaît (Pfohl-Leszkowicz et coll., 2002b). L'administration simultanée à des souris d'OTA (1 µg/kg/j) et de vitamine C (10 mg kg/j) réduit la fréquence des aberrations chromosomiques (diminution des anomalies lors de la mitose et de la méiose) (Bose et Sinha, 1994). L'effet protecteur de la vitamine C est particulièrement important au niveau de la division cellulaire.

7.2.4. Effets protecteurs du bicarbonate de sodium (Na HCO₃)

Yong et Coll. (1987) ont montré chez le rat que l'administration du bicarbonate de sodium (pH = 8) favorise d'une part, l'excrétion urinaire de l'OTA, et d'autre part le clivage de l'OTA en OTα et en phénylalanine.

D'après ces auteurs, l'augmentation du pH urinaire (alcalinisation de l'urine) accroîtrait l'ionisation et la dissociation de l'OTA, les composés ionisés étant éliminés plus rapidement.

De plus, on note une diminution de la fréquence des lésions induites par l'OTA au niveau du foie, du cœur, des reins en présence de NaHCO₃.

Cependant, l'administration de NaHCO₃, de façon régulière et prolongée modifie un certain nombre de paramètres biochimiques au niveau du cerveau, notamment en ce qui concerne les taux d'acides aminés libres. Le NaHCO₃ abaisserait le taux de phénylalanine.

Il semblerait donc, d'après ces données que l'utilisation de cette molécule, en tant qu'agent de détoxification, devrait être reconsidérée.

7.2.5. Effets protecteurs de la cholestyramine

Le cycle entérohépatique de l'OTA peut être inhibé par l'action de la cholestyramine (agent séquestrant les acides biliaires), dont la toxicité est pratiquement nulle et qui, administrée per os, fixe la toxine et augmente ainsi son élimination dans les fèces (Roth et coll., 1988). Cette résine échangeuse d'ion agirait en fixant l'OTA sous forme d'un complexe insoluble et inhiberait ainsi sa réabsorption au niveau de l'intestin, ce qui favoriserait son élimination. La cholestyramine semble aussi diminuer la biodisponibilité de l'OTA et l'excration urinaire de l'OTA en diminuant son absorption digestive et en favorisant son élimination fécale, ce qui permet de débarrasser l'organisme de l'OTA.

7.3. Mesures d'hygiène ou bonnes pratiques agricoles

Les mycotoxines posent un problème important de santé publique, pour l'agriculture et sur le plan économique. Les épices comme les autres aliments sont susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines. Pour pouvoir lutter contre les mycotoxines, il faut savoir à quel moment elles se développent. Il est

possible de définir six moments privilégiés au cours de l'élaboration d'un produit : lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation, de l'alimentation des animaux et lors de la consommation par les êtres humains.

Ainsi, il est nécessaire de mettre en place des bonnes pratiques agricoles

Les moyens de lutte pour chaque période définie sont consignés dans le tableau suivant et ne sont pas exhaustifs (Pfohl-Leszkowicz, 1999)

Tableau VII : Méthodes de lutte contre la contamination

Période définie	Solutions proposées :
Au champ	- créer des plantes résistantes - limiter le développement par l'emploi de fongicides - arrosage adapté - apport en minéraux
A la récolte	- veiller à la maturité du grain - inspection visuelle pour éliminer les éléments abîmés - éviter les récoltes par temps humide
Au stockage	- contrôle périodique - maintenir une bonne température - contrôler l'humidité - détruire les produits contaminés - une bonne aération des silos.
A la transformation	- contrôle mais, plus au niveau des mycotoxines que des moisissures.
Dans l'alimentation des animaux	- tests de contamination, puis décontamination si nécessaire
A la consommation	- éliminer les aliments contaminés - jouer sur la cuisson

Chapitre 8. Présence naturelle de l'OTA dans les produits végétaux et animaux

Découverte de façon fortuite en 1965 par des chimistes Sud-Africains, la présence naturelle de l'OTA dans les produits alimentaires n'avait pas été rapportée dans cette région. C'est en 1969 que Shotwell et coll. ont signalé des cas de contamination naturelle dans le maïs. Par la suite, la mycotoxine a été identifiée dans de nombreux produits végétaux et animaux qui sont à l'origine de la contamination humaine. Les services de contrôle des états membres de l'Union Européenne ont découvert que l'OTA élaborée de préférence au niveau des denrées à caractère acide est un contaminant naturel présent essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine, sorgho...), mais aussi dans les abats et les viandes d'animaux recevant des aliments contaminés (Jorgensen, 1998), ainsi que dans le riz, le soja, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs (figues, pruneaux) (Krogh, 1987). On note également la présence de l'OTA dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes. On la retrouve aussi dans la bière (El-Dessouki, 1992 ; Scott et Kanhere ; 1995) et même dans le vin et le jus de raisin (Zimmerli et dick, 1996). De même, on a pu la mettre en évidence dans le sang et les tissus des animaux d'élevage (volaille, porc...) où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique (Gareis, 1996 ; Hult et coll, 1984 ; Terplan et Wenzel, 1993). Tableau VIII et IX

Tableau VIII : Distribution naturelle de l'ochratoxine A dans les produits d'origine végétale (Bendele, 1985a)

Produits	Pays d'origine	Taux de contamination (ng/g)	Références
arachide	Canada	4900	Scott et coll. (1972)
	Inde	50-200	Rao et coll. (1979)
	Côte d'Ivoire	6-64	Sangaré et al (2006)
Blé	USA	5-115	Shotwell et coll.(1976)
	Canada	20-100	Scott et coll. (1972)
	Yougoslavie	14-135	Pavlovic et coll. (1979)
	Inde	30-50	Rao et coll. (1979)
	Allemagne	0.1-137	Bauer et Gareis (1987)
Maïs	USA	83-166	Shotwell et coll. (1976)
	France	15-200	Galtier et coll. (1977)
	Inde	30-50	Rao et coll. (1979)
	Yougoslavie	6-140	Pavlovic et coll. (1979)
	Côte d'Ivoire	3-1738	Sangaré et al (2006)
Sorgho	Inde	50-70	Rao et coll. (1979)
Orge	Yougoslavie	14-27	Pavlovic et coll. (1979)
Céréales	Yougoslavie	0.01-68900	Pepeljnak et Cvetnic (1985)
Avoine	Allemagne	0.1-206	Bauer et Gareis (1987)
Riz	Japon	230-430	Sugimoto et coll. (1977)
	Côte d'Ivoire	9-92	Sangaré et al (2006)
mil	Côte d'Ivoire	17-204	Sangaré et al (2006)
Figue	Suisse	160	Baumann et Zimmerli (1988)
Café vert	Italie	0.5-23	Cantafora et coll. (1983)
Café torréfié	Italie	0.6	Etude SCOOP (2002)

Tableau IX : distribution de l'ochratoxine A dans les produits d'origine animale (Bendele, 1985a)

Produits	Pays d'origine	Taux de Contamination (ng)	Référence
Lait	Allemagne	0.017-0.03	Bauer et Gareis (1987)
Fromage	Yougoslavie	820-1100	Skrinjar et Zakula (1985)
Œuf	Pologne	0.7-13	Juszkiewicz et coll. (1982)
Viande fumée	Yougoslavie	10-920	Pepeljnak et Blazevic (1982)
Saucisse	Allemagne	0.1-3.4	Scheuer et Leistner (1986)
	Suisse	0.8	Baumann et zimmerli (1988)
Porc (rein)	Yougoslavie	16-77	Pepeljnak et Cvetnic (1985)
	Suisse	0.1-0.3	Baumann et zimmerli (1988)
	Danemark	0.5-19.55	Bauer et Gareis (1987)
	Allemagne	0.1-1.8	Bauer et Gareis (1987)

L'OTA contamine plusieurs denrées alimentaires comme le café, le cacao les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine, riz, ...), ainsi que le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs. On peut également en trouver sur le raisin et les produits dérivés comme le vin.

L'ochratoxine A est aussi retrouvée dans les épices qui sont très utilisés en cuisine notamment en cuisine ivoirienne.

- **En côte d'Ivoire**

Des études sur la contamination des aliments par l'OTA ont été effectuées par Sangaré *et al.* (2006a ; b). Il ressort de ces études préliminaires que tous les aliments échantillonnés mil (n = 33); maïs (n = 41) ; riz (n = 10); arachide (n = 10) sont contaminés par l'OTA. Le maïs est l'aliment le plus contaminé avec une moyenne de 870,5 µg/kg. Cette valeur obtenue montre une forte contamination. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau x.

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

matrices	Etendue des concentrations d'OTA en µg/kg	Concentration moyenne en µg/kg	Nombre d'échantillons
Mil	17 à 204	110,5	33
Maïs	3 à 1738	870,5	41
Riz	9 à 92	50,5	10
arachide	6 à 64	35	10

D'autres études ont été menées en Côte d'Ivoire notamment sur le cacao au niveau des ports d'Abidjan et de San Pedro ainsi que dans les zones de production. Ces études ont montré que les fèves de cacao sont contaminées par l'OTA avec des moyennes de 0,7 µg/kg au port de San Pedro, de 1,3 µg/kg au port d'Abidjan (Dembele, 2009) et de 0,69 µg/kg dans les zones de production (Adama, 2012).

I. Cas des épices

1. Histoire et origine des épices

Dès l'antiquité, les épices étaient utilisées pour relever la saveur des plats, mais également pour leurs vertus médicinales, ainsi qu'en parfumerie pour fabriquer des onguents ou encore pour embaumer les morts (chez les égyptiens)

Au moyen âge, les épices figuraient parmi les produits les plus recherchées. Très vite, elles sont devenues des monnaies d'échange (notamment le poivre). Le mot « épice » tire son origine du latin « species », qui signifie « espèce » « substance ». L'expression « payer en espèce » dérive directement de l'usage d'alors, payer en « épice », payer en « species »

Grâce à l'ouverture des voies maritimes entre l'Europe et l'Asie, le commerce des épices a cru de manière intense au XVème siècle. La route des épices

commença en Méditerranée : les marchands arabes étaient les premiers à rapporter en occident des épices de Chine et d'Inde.

Ils acquièrent alors un rôle influent en Méditerranée puis, les navigateurs portugais, sur les pas de Vasco de Gama, ont franchi le Cap de Bonne Espérance. Ils se lancèrent alors dans le commerce des épices, particulièrement fructueux. Les arabes contrôlèrent la route des épices au nord et les portugais au sud. Les marchands hollandais et britanniques ont créé au XVIIème siècle les compagnies et comptoirs sur les côtes asiatiques. Les français s'installèrent aux Indes en 1654. Quelques années plus tard, la culture des épices se développa dans les colonies : Guadeloupe, Martinique, Madagascar, la Réunion et l'Ile Maurice. Au fur et à mesure que la production d'épices s'étendait, les coûts baissaient, les épices devenaient accessibles à un plus grand nombre et leur utilisation dans la cuisine se démocratisa. Actuellement, la plupart des épices proviennent des régions au climat tropical : Inde, Indonésie, Asie du Sud Est, Mexique, Pérou et Antilles. Néanmoins, le Canada et la France dérogèrent légèrement à cette règle. En effet, depuis quelques années, la culture du safran s'est développée dans le centre et le sud de la France.

2. Les différents types d'épices

Les épices proviennent de familles végétales différentes. Par exemple le gingembre, la cardamone et le curcuma appartiennent à la famille des zingibéracées, alors que le cumin, le carvi et la coriandre appartiennent aux Apiacées, la moutarde et le raifort sont des brassicacées

Cinq types d'épices se distinguent selon la partie de la plante utilisée :

Les épices issues de la partie souterraine (bulbe, rhizome) : curcuma, gingembre, raifort, réglisse, etc.

Les épices issues de la partie aérienne de la plante (tiges, feuilles) : basilic, thym, laurier, persil, cannelle principalement, les parties aériennes étant le plus souvent des herbes aromatiques

Les épices issues des inflorescences : clou de girofle, safran

Les épices issues de fruit : noix de muscade, piment, poivre, baie de genièvre, vanille, etc.

Les épices graines : moutarde, cumin, nigelle, anis, cacao, coriandre, fenouil, etc.

Les épices sont de puissants aromatisants à goût variable. Leur intensité est liée à leur parfum, ainsi qu'à la « chaleur » qu'elles dégagent en bouche. Mesurer le piquant ou l'intense reste difficile et abstrait, d'autant que de telles perceptions demeurent intimement liées aux spécificités et aux habitudes gustatives de chacun.

Nous allons axer notre travail sur trois épices : le gingembre, le piment et le poivre.

2.1. Le gingembre

2.1.1. Origine et histoire du gingembre

Le gingembre vient du latin « *zingiber* », lui-même emprunté au grec « *zingiberis* ». Il aurait été emprunté à l'arabe « *zangabil* », qui trouve son origine dans le terme sanskrit *srngavera* (en forme de corne) source des noms actuels du gingembre en Inde.

Le gingembre, originaire d'Inde et de Malaisie, est l'une des premières épices à être importé dans le bassin méditerranéen.

2.1.2. Description du gingembre

Le gingembre (*zingiber officinale*), qui appartient à la famille des zingibéracées, est une plante vivace, tropicale, qui atteint plus d'un mètre de hauteur.

Le gingembre est caractérisé par un rhizome qui produit d'une part les racines de la plante et d'autre part ses feuilles et ses fleurs. Le gingembre ne fleurit qu'exceptionnellement. La production des graines est donc très rare, les fruits en forme de capsules, contiennent des graines noires enrobées d'une gaine blanche.

Les variétés du gingembre :

- Le gingembre blanc ou gingembre jaune appelé aussi turmeric ginger
- Le gingembre bleu aussi appelé flint ginger



Figure 8: gingembre (*zingiber officinale*) (Köhler, 1883)

Le gingembre appartient au Règne : *Plantae* ; Sous-règne : *Tracheobionta* ;
Division : *Magnoliophyta* ; *Classe* : *Liliopsida* ; *Sous-classe* : *Zingiberidae* ;
Ordre : *Zingiberales* ; *Famille* : *Zingiberaceae* ; *Genre* : *Zingiber*

2.1.3. Culture

Le gingembre est cultivé dans la majorité des régions tropicales humides (2000 mm de pluie). La multiplication est réalisée par fragmentation du rhizome (morceaux de 3 à 5 cm avec au moins un bourgeon). Planté dans un sol riche et bien drainé, il faut le sarcler régulièrement pour éviter la concurrence d'adventices. Les rhizomes sont récoltés, le plus souvent de façon manuelle, après 9 à 10 mois lorsque les parties vertes se dessèchent. Pour le gingembre jeune, la récolte se fait dès 5 à 6 mois. La partie qui n'est pas commercialisée fraîche est soit ébouillantée soit pelée avant d'être séchée une dizaine de jours. On obtient ainsi, respectivement, du gingembre gris ou du gingembre blanc. Il peut aussi être en poudre à ce stade.

2.1.4. Propriétés

Le gingembre peut être consommé frais ou sous forme de poudre et possède différentes propriétés

- Le gingembre est avant tout reconnu pour ses propriétés tonifiantes, stimulantes et revitalisantes. Il est donc recommandé en cas de fatigue, manque de tonus, manque de vitalité, manque d'énergie.
- Le gingembre possède une action anti-inflammatoire, antibactérienne, antiseptique et antiparasitaire
- Le gingembre se révèle efficace comme fébrifuge, analgésique et expectorant. C'est pourquoi il est souvent associé dans la préparation des remèdes contre la fièvre, les maladies infectieuses, les bronchites, la toux, la grippe et les maux de gorge
- Le gingembre est également utilisé en médecine vétérinaire pour calmer les coliques et les bronchites.
- Enfin, il est renommé pour son pouvoir aphrodisiaque en cas d'asthénie sexuelle.

2.2. Le piment

2.2.1. Origine et histoire du piment

La culture du piment est très ancienne; on le pense originaire du Brésil. Au Mexique, à Tehuacan, on le cultivait déjà 7500 ans avant Jésus Christ. On utilisait les piments pour leurs propriétés médicinales, comme condiment ou comme légume. Les piments ne furent introduits en Europe qu'à la fin du XVe siècle, à la suite des voyages de Christophe Colomb. Découvert par les Espagnols à Saint-Domingue, le piment devint rapidement «l'épice du pauvre». En effet, au 17 ème et 18 ème siècle, les épices importées coûtaient très cher et constituait un signe extérieur de richesse. Le piment remplaça donc le « poivre d'Inde », plus cher à l'époque.

À l'origine, la culture du piment n'était faite qu'à des fins décoratives ; par la suite, on l'utilisa en médecine et on l'apprécia ensuite pour sa valeur culinaire. S'adaptant très facilement, il s'est propagé rapidement, surtout grâce à Magellan qui l'introduisit en Afrique et en Asie. On le cultive maintenant sur tous les continents. C'est au Mexique et aux Antilles que l'on retrouve le plus grand nombre de variété

2.2.2. Description du piment

Le piment (*capsicum sp*) appartient à la famille des solanacées. C'est un arbrisseau vivace de 1 à 1,20 m de hauteur. Il est caractérisé par des feuilles qui ont un limbe entier simple, mince et généralement ovale et acuminé. Le nombre de nervure est de 10. La tige se ramifie facilement et fournit de nombreuses branches latérales. Les fleurs apparaissent solitaires au sommet d'un pédicelle prenant naissance à un nœud de la tige. Les fleurs ne restent ouvertes que durant 2 à 3 jours. Le fruit est petit érigé, conique et pointu, indéhiscent.

Il existe plusieurs variétés de piment mais nous citerons quelques exemples :

- *Alma paprika* : piment peu fort, très belle variété de piments tomate de Hongrie, saveur délicieuse, fruits rouges à complète maturité de 80 à 120 grammes
- *Ampuis* : piment doux, petits fruits rouges à maturité, très fripés en forme de lanternes et à la peau fine
- *Anaheim* : piment fort de niveau 4 à 6 sur l'échelle de scoville, fruits élancés de 15 à 20 cm de longueur consommés le plus souvent verts et devenant rouges à maturité
- *Bouquet* : piment fort, bouquets de fruits érigés de plusieurs couleurs jaune, orange et rouge.

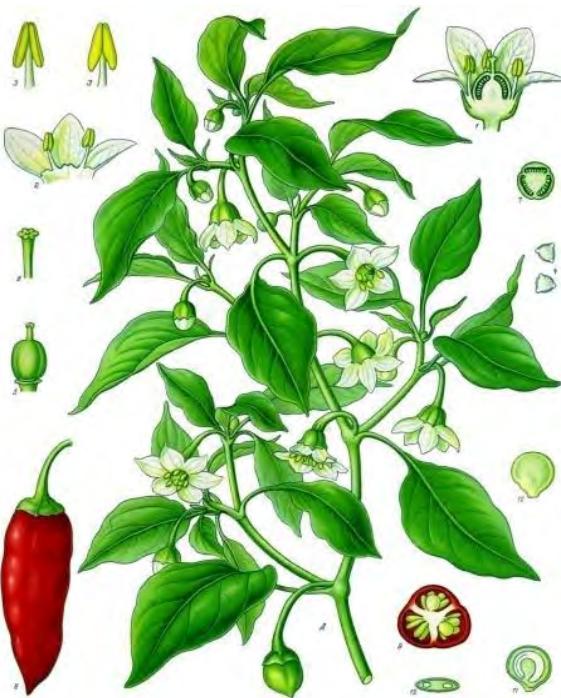


Figure 9 : piment (*capsicum*) (Köhler, 1887)

Le piment appartient au Règne : *Plantae* ; Sous-règne : *Tracheobionta* ; Division : *Magnoliophyta* ; Classe : *Magnoliopsida* ; Sous-classe : *Asteridae* ; Ordre : *Solanales* ; Famille : *Solanaceae* ; Genre : *Capsicum*

2.2.3. Culture

Le piment pousse dans toutes les régions tropicales jusqu'à 2000 m d'altitude. C'est l'une des épices des plus faciles à cultiver et ce, aussi bien en climat tropical que tempéré. Les graines gardent leur pouvoir germinatif pendant 2 à 3 ans, ce qui a facilité la diffusion du piment sur tout le globe

Les piments bien mûrs sont séchés sur des claies, dans un endroit sec, chaud, aéré, pendant une semaine environ. La fructification du piment prend de nombreuses formes (allongées, ronds, pointus, ...) avec des dimensions très variables (de quelques centimètres à plus de 25 cm) et des couleurs variées (rouge, orange, jaune, vert mais aussi marron, noir, violet, voire blanc).

2.2.4. Propriétés

La majorité des vertus du piment sont dues à la capsaicine, cette molécule provoque une sensation de douleur, de piquant. Ainsi l'organisme libère des endorphines (molécules proches de la morphine), ce qui déclenche une sensation de bien être et explique le développement d'une dépendance et accoutumance aux piments.

La capsaicine est à l'origine de la majorité des propriétés des piments : décongestionnantes, expectorantes et calmantes. Consommé frais, il favorise la digestion des féculents, stimulant, apéritif, stomatique, rubéfiant (fait rougir la peau)

2.3. Le poivre

2.3.1. Origine et histoire du poivre

Le poivrier, qui donne les baies de poivre noir très prisées en tant qu'épice alimentaire, est cultivé depuis plus de 3000 ans en Inde et était déjà connu en Grèce au 4e siècle avant Jésus-Christ. C'est l'une des épices les plus anciennes de l'humanité. Dans les temps anciens, le poivre noir était une des denrées les plus précieuses sur les routes caravanières d'Orient. À certaines époques, le poivre valait son pesant d'or. Les routes commerciales terrestres peu sûres incitèrent les nations européennes de navigateurs comme l'Espagne et l'Italie à se lancer à la recherche de routes maritimes. Au début du Moyen Âge, les princes vénitiens et les grandes maisons de commerce s'attribuèrent en quelque sorte un monopole commercial et purent de ce fait amasser une fortune et des richesses considérables. La production annuelle mondiale de poivre noir est actuellement d'environ 250 000 tonnes. Les principaux producteurs sont l'Inde, le Vietnam, l'Indonésie et la Malaisie.

2.3.2. Description du poivre

Le poivrier (*Piper nigrum*) est une liane vivace à tige ligneuse se fixant à son support par des racines adventices aériennes (crampons) qui se développent au point d'insertion des feuilles sur la tige. Les inflorescences sont des épis de 7 à 10 m de long, opposés aux feuilles. Les fruits sont des baies rondes faiblement charnues. D'abord vertes, elles jaunissent puis rougissent à maturité et deviennent noires par dessiccation.

Les variétés de poivre :

- Poivre à queue ou cubète : moins fort que le poivre noir, il provient des îles indonésiennes. Peu utilisé en Europe, il est un élément essentiel des cuisines asiatiques et océaniques
- Poivre de sichuan : issu d'un petit arbre épineux de la famille du frêne. Il possède une baie très parfumée, mais seule la coque de la baie apporte son arôme, elle est utilisée séchée. La graine en elle-même est dure et amère
- Le poivre blanc ou poivre de Singapour : plus doux, appelé mignonnet, il est cueilli à maturité complète, à partir des baies rouges bien mûres que l'on fait longuement tremper afin de débarrasser les graines de l'enveloppe (péricarpe) ; il peut aussi être obtenu à partir de poivre noir bien sec, c'est le poivre le moins âcre.
- Poivre de la Jamaïque : extrait des graines de la fleur d'un arbre appelé pimenta qui pousse dans les caraïbes et en Amérique centrale, connu également sous le nom de poivre giroflée



Figure 10 : poivre (*Piper nigrum*) (Köhler, 1887)

Le poivre appartient au Règne : *Plantae* ; Division : *Magnoliophyta* ; Classe : *Magnoliopsida* ; Ordre : *Piperales* ; Famille : *Piperaceae* ; Genre : *Piper*

2.3.3. Culture

En culture, les plantes sont placées aux pieds de piquets ou d'arbres qui ombragent les plantations de café ou de théiers, parfois sur des piquets formant ainsi des colonnes de poivriers. Il est souvent planté en culture secondaire. On le maintient en le taillant à une hauteur raisonnable pour permettre une cueillette facile.

Les plants sont le plus souvent multipliés par bouturage de tronçons de 50 cm-60 cm. Ainsi les lianes sont productives à l'âge de 3 ans, les semis mettent 7 à 8 ans pour produire. Dans tous les cas les lianes produisent pendant un maximum d'une trentaine d'années.

2.3.4. Propriétés du poivre

Le poivre noir moulu peut être consommé en petite quantité à chaque repas. Il permet de relever un plat, et de lui apporter un léger piquant. Il ne contient aucune calorie.

Les huiles essentielles obtenues par un procédé de distillation, à la vapeur d'eau, des baies de *Piper nigrum* concassées de poivre noir peuvent être utilisées en thérapie. Cette huile essentielle est utilisée en cosmétique, pour la réalisation de parfums masculins, car elle a une odeur épicee et suave. Elle est également utilisée par voie externe, appliqué sur le ventre, pour faciliter et accélérer le transit ou sur les muscles en cas de courbatures ou de douleurs.

Elle posséderait des propriétés aphrodisiaques.

2.3.5. Importance économique des épices

Les principaux pays producteurs d'épices exotiques sont l'Inde (poivre, gingembre, cardamome), l'Indonésie (gingembre), le Sri Lanka (cannelle), le Brésil (poivre), la Jamaïque (piment), Madagascar (giroflier). Les plantes à épices des pays tempérés ne donnent pas lieu à des analyses statistiques fiables. La production mondiale annuelle des épices est de 1 868 700 tonnes (2003-2004) ; l'inde représente 86% de cette production

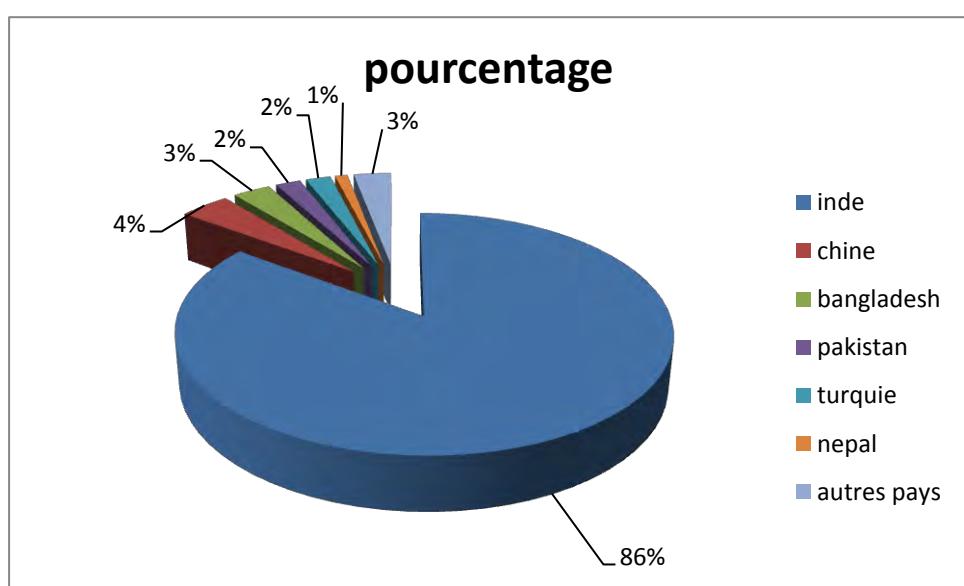


Figure 11 : production mondiale annuelle des épices (2003-2004)

Chapitre 9. Législation et réglementations en OTA sur les épices

1. Règlement portant fixation des teneurs maximales pour l'OTA concernant les épices

Le règlement (UE) n° 105/2010 de la Commission modifiant le règlement (CE) N° 1881/2006 a fixé, pour les épices, une teneur maximale en ochratoxine A plus faible, teneur censée être atteinte grâce à l'application de bonnes pratiques. Pour permettre la mise en place des mesures de prévention par les pays producteurs d'épices et pour éviter des perturbations d'ampleur inacceptable dans les échanges commerciaux, il a en outre prévu l'application provisoire d'une teneur maximale plus élevée. Il dispose également qu'une évaluation doit être réalisée pour déterminer si les différentes régions productrices du monde sont en mesure d'atteindre des teneurs d'ochratoxine A plus faibles par l'application de bonnes pratiques. Cette évaluation doit précéder la mise en application de la teneur maximale en ochratoxine A réduite. Malgré les très nettes avancées constatées dans les régions productrices à travers le monde en matière d'application de bonnes pratiques, la teneur maximale en ochratoxine A plus faible qui devait être appliquée reste invariablement hors d'atteinte pour les plantes du genre *Capsicum*. Il y a donc lieu de reporter l'application de cette limite plus stricte pour *Capsicum spp.*

Les différents taux arrêtés dans ce règlement sont consignés dans le tableau XI

Tableau XI : teneurs maximales (en µg/kg) en OTA dans les épices (2012)

<p>Épices</p> <p><i>Capsicum spp.</i> (fruits séchés dérivés, entiers ou en poudre, y compris les piments, la poudre de piment, le poivre de Cayenne et le paprika)</p> <p><i>Piper spp.</i> (fruits dérivés, y compris le poivre blanc et le poivre noir)</p> <p><i>Myristica fragrans</i> (noix de muscade)</p> <p><i>Zingiber officinale</i> (gingembre)</p> <p><i>Curcuma longa</i> (safran des Indes)</p> <p>Mélanges d'épices contenant une ou plusieurs des épices susmentionnées</p>	<p>30 µg/kg</p> <p>15 µg/kg à</p>
<p>Réglisse (<i>Glycyrrhiza glabra</i>, <i>Glycyrrhiza inflate</i> et autres espèces)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bois de réglisse, ingrédient pour infusion • Extrait de réglisse (42), pour utilisation dans des produits alimentaires, en particulier les boissons et la confiserie 	<p>20 µg/kg</p> <p>80 µg/kg»</p>

Conclusion partielle

Au terme de ces chapitres, nous avons constaté que l'ochratoxine A représente un danger pour la santé humaine et animale et qu'elle pouvait contaminer les denrées alimentaires et également les épices qui sont consommés de plus en plus par les populations ivoiriennes.

Les coûts humains et monétaires des maladies associées à la contamination des aliments sont considérables. C'est pourquoi des mesures réglementaires et un contrôle sont nécessaires à chaque étape de la production et de la transformation afin de diminuer les risques de contamination. Ainsi les pays devraient entreprendre des actions pour la fixation des limites de contamination en OTA des denrées alimentaires en particulier dans les épices et participer à la détermination des normes sur un taux maximal de contamination toléré et acceptable.

En Côte d'Ivoire, les investigations relatives à la présence des mycotoxines dans les épices en général et à l'OTA en particulier restent assez limité. D'où l'intérêt de notre présent travail.

DEUXIEME PARTIE :

ETUDE DE LA CONTAMINATION DES EPICES PAR L'OTA

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire Central d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie (LCAE). Cette étude s'est déroulée d'octobre 2011 à juin 2012. Elle porte sur le dosage de l'OTA dans les échantillons d'épices (le gingembre, le piment et le poivre) afin de déterminer le niveau de contamination de l'ochratoxine A. Cette étude s'est déroulée en deux étapes

- Une partie consacrée à la collecte des échantillons
- une partie analytique : dosage de l'OTA

Chapitre 1. Matériel

1. Matériel utilisé

➤ Verreries et accessoires

- Balance de précision (shimadzu)
- Erlenmeyer, bêcher
- Eprouvette graduée de 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml
- Tube à essai en verre, portoir, pipette, pissette en plastique
- Seringue destinée à l'injection de l'échantillon dans le système HPLC
- Micropipette réglable : P20, P100, P1000
- Papier aluminium
- Etuve (Selecta)
- Réfrigérateur (Electrolux)
- Dispositif de filtration type Büchner
- Agitateur vibrant ou Vortex type VM3 (Karl Hecht KG)
- Waring Blender (moulinex).
- Centrifugeuse Universal 320 R

➤ Consommables

- Colonne d'immunoaffinité (ochrapep) type : R-biopharm
- Papier filtre whatman n 4

➤ Réactifs

- Solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 1% (m/v) (Scharlau)
- Méthanol qualité HPLC (Merck)
- Pastille de sel pour tampon phosphate salin (PBS) (R-Biopharm)
- Acétonitrile qualité HPLC (SDS)
- Acide acétique (Merck)
- Hypochlorite de sodium

➤ Produit de référence

- Solution standard d'OTA à 10 µg/ ml (R-Biopharm)

➤ Préparation des réactifs

- Solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 1% (m / v) (SCHARLAU)
Pesar 10 g d'hydrogénocarbonate de sodium et le mettre dans une fiole jaugée d'1 litre. Y ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge et mélanger sur agitateur magnétique.
- Mélange méthanol / hydrogénocarbonate de sodium 1% (50/50)
Mettre 500 ml de méthanol dans une fiole jaugé de 1litre et le compléter avec 500 ml d'hydrogénocarbonate de sodium à 1% jusqu'au trait de jauge puis mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique.
- Pastilles de sel pour tampon phosphate salin (PBS) (R-BIOPHARM)
Une pastille pour 100 ml d'eau déminéralisée
- Phase mobile : acétonitrile / eau qualité HPLC / acide acétique (55/43/2)
Pour 500 ml prélevé : 55% d'acétonitrile = 275 ml
2% d'acide acétique = 10 ml
43% d'eau qualité HPLC (Eau déminéralisée) = 215 ml
Mélanger l'ensemble à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtrer et dégazer à l'aide d'une pompe à vide.
 - Mélange méthanol / acide acétique (98/2) (v/v)
Pour 100 ml, prélever 98 ml de méthanol et 2 ml d'acide acétique.

2. APPAREILLAGE

- Système HPLC (chromatographie liquide haute performance) composé de :
 - Un réservoir de phase mobile (bouteille d'une capacité de 1 litre, réservoir unique pour régime isocratique)
 - Un dégazeur (Shimadzu degazer) modèle DGU-20A₅
 - Une pompe (Shimadzu liquide chromatographique) modèle LC-20AT
 - Un détecteur à fluorescence (Shimadzu fluorescence detector) modèle RF 10 AXL

Chapitre 2. Méthodologie

1. Echantillonnage

1.1. Collecte des échantillons

Elle constitue la première étape de notre travail. Elle s'est déroulée du 26 octobre 2011 au 13 mars 2012 dans les différentes communes d'Abidjan.

Les échantillons de piment sec et les échantillons de poivre ont été prélevés sur un seul site : le grand marché d'Adjame précisément au marché « Gouro » pour le piment sec et au marché « forum » pour le poivre. Quant aux échantillons de gingembre, ils ont été prélevés sur différents sites (Cocody, Abobo, Yopougon, Marcory). Les échantillons ont été collectés de manière aléatoire pour chaque échantillon

1.2. Description des épices collectées

- piment**

Les échantillons de piment collectés étaient vendus secs dans des bassines laissées à l'air libre, il y avait un mélange de plusieurs variétés. (Figure 12)



Figure 12 : échantillon de piment

- **le poivre**

Le poivre se présentait sous forme de grains secs de couleur noir emballés dans des sachets



Figure 13 : poivre

- **le gingembre**

Le gingembre a été collecté sous forme de pastilles semi transformé vendus aux différents carrefours des communes d'Abidjan.



Figure 14 : pastilles de gingembre

2. Mise au point de la méthode HPLC

Le protocole de dosage de l'OTA est issu du laboratoire central d'agrochimie et d'écotoxicologue d'Abidjan (LCAE) où les échantillons ont été analysés. Tous les échantillons ont été conservés au congélateur à – 20°C avant le début des analyses.

➤ Broyage

Chaque échantillon de piment et de poivre est finement broyé et mélangé à l'aide d'un mixeur afin d'obtenir une homogénéisation parfaite.

Pour ce qui est du gingembre, on a effectué un broyage manuel à l'aide d'un mortier et d'un pilon en porcelaine. (Voir en annexe)

➤ Extraction

15 g de chaque échantillon est pesé à l'aide d'une balance de précision et mis dans un erlenmeyer ou un ballon à fond plat. On y ajoute 150 ml de mélange méthanol/hydrogénocarbonate de Na à 1%. Le mélange est agité pendant 15 minutes à 1300 tours/mn à l'aide d'un agitateur magnétique. La solution est filtrée sur Büchner sur du papier filtre Whatman n°4. 11 ml du filtrat sont dilués avec 11 ml de tampon PBS et mélangés au vortex. (Voir en annexe)

➤ Purification sur colonne d'immunoaffinité

La colonne d'immunoaffinité (Ochrarprep) qui contient une suspension en gel d'anticorps (Ac) monoclonaux fixés par covalence à un support solide.

Les colonnes d'immunoaffinité sont sorties du réfrigérateur 30 mn avant le début du test et laissées à la température ambiante. On les vide de leur liquide de conservation dans des flacons de récupération. Puis on conditionne la colonne avec 10 ml de tampon PBS à un débit de 3ml/mn. Il faut éviter de sécher la colonne car le tampon PBS assure la protection des Ac et donc permet d'éviter leur dégradation par des substances fortes comme les solvants d'extraction. On prélève 20 ml de l'extrait et on fait passer l'échantillon sur la colonne d'immunoaffinité à un débit de 2 ml/mn grâce à la pompe à vide. L'OTA est capturée par les Ac de la suspension gélosée. La colonne est lavée avec 10 ml de

tampon PBS à un débit de 3 ml/mn afin d'éliminer les composants étrangers et non spécifiques puis les eaux de lavages sont versées. L'OTA est élue par 1,5 ml du mélange méthanol/acide acétique en 3 étapes de 0,5 ml avec une pause d'une minute entre chaque étape. Ensuite éluer par 1,5 ml d'eau déminéralisée à un débit de 0,5 ml/mn. L'éluat est récupéré dans un flacon pour analyse HPLC. Le volume final obtenu est de 2,8 ml et non 3 ml car il reste toujours une petite quantité dans la colonne. (Voir en annexe)

➤ Dosage par le système HPLC

• Principe de la méthode

La chromatographie liquide haute performance (HPLC), est une technique analytique qui permet la séparation d'un ou plusieurs composés contenus dans un mélange en vue de leur caractérisation et de leur quantification : le système permettant d'effectuer cette séparation est appelé système de phase et est composé de la phase stationnaire et de la phase mobile.

La méthode de chromatographie HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie d'absorption en phase inverse. La phase stationnaire utilisée est constituée de groupements C₁₈ greffés sur un support de silice.

• Conditions de la chromatographie HPLC

- Phase stationnaire : colonne HPLC, phase inverse spherisorb C18 S5 ODS 2,5µm (25cm x 4,6mm)
- Phase mobile : acétonitrile/eau qualité HPLC/acide acétique (55/43/2)
- Débit : 1 ml/mn
- Détection fluorescente : longueur d'onde d'excitation : 330 nm ; émission : 460 nm
- Volume d'injection : 100 µl
- Temps de rétention : environ 8 à 9 minutes.

3. Qualification de la méthode

➤ Préparation des solutions étalons d'OTA

▪ Solution mère

Elle est obtenue à partir de la solution commerciale titrée à 1 mg/ml.

La concentration de cette solution est confirmée par la méthode ci-dessous décrite :

3.1. Confirmation de la concentration de la solution mère de l'étalon au spectrophotomètre UV

L'étalon de l'ochratoxine A est sous forme de film ou de poudre dans un flacon ; la reconstitution de la solution mère de l'étalon peut entraîner des pertes donc réduire la véritable concentration de notre étalon. Pour ce faire, on dilue le film dans 10 ml du mélange toluène/acide acétique (99/1) et on mesure l'absorbance à 333 nm dans une cuve de quartz de 1 cm, le mélange toluène/acide acétique (99/1) étant bien attendu dans la cuve de référence.

La concentration C (exprimée en mg/l) de la solution est déterminée comme suit :

$$C = \frac{A \times M}{\epsilon \times \sigma} \times 100 \times f$$

A max est l'absorption déterminée au maximum de la courbe de l'absorption (ici : à 333nm)

Le M est la masse moléculaire relative d'ochratoxine A (M = 403,8g/mol) ;

ε est l'absorption molaire (5440 m²/mol) d'Ochratoxine A dans le mélange de solvant toluène /acide acétique.

Le σ est la longueur de chemin de la cellule du quartz dans les centimètres.

Cette concentration est utilisée pour la préparation de la gamme des concentrations de la courbe d'étalonnage. Cette solution peut être conservée pendant 2 ans à – 18°C.

▪ Solution intermédiaire ou solution B

1 ml de la solution mère est mis à évaporer, à sec, sous flux d'azote ; l'extrait sec est récupéré dans une fiole jaugée de 100 ml par un mélange de méthanol/acide acétique/tampon phosphate (49/1/50) ; on obtient alors une solution à 0,9 mg/l dans le tampon phosphate.

3.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

Il faut autant que possible, protéger les solutions d'ochratoxine de la lumière. Elles sont conservées dans les flacons en verre ambré en chambre froide positive. Leur durée de vie est de un an. A partir de la solution intermédiaire, nous avons préparé une série de solution étalons dans un mélange méthanol/acide acétique/tampon phosphate (49/1/50) de la façon suivante :

Tableau XII: Solutions d'étalonnage

Solutions	N°	Solution préparée à partir de	Dilution	<i>Concentration à environ</i>
Solution étalon	1	Solution intermédiaire	100	9,0 µg/l
Solution étalon	2	Solution intermédiaire	200	4,5 µg/l
Solution étalon	3	Solution étalon N° 1	5	1,8 µg/l
Solution étalon	4	Solution étalon N° 1	20	0,45 µg/l
Solution étalon	5	Solution étalon N° 1	100	0,09 µg/l
Solution étalon	6	Solution étalon N° 1	500	0,018µg/l

3. Détermination de la concentration de chaque échantillon

La détermination de la concentration se fait soit par la courbe d'étalon ou par calcul. Ces deux manières sont équivalentes.

L'identification de l'OTA présent dans les échantillons de piment, de poivre et de gingembre s'est déroulée à un temps de rétention variant entre 8 et 9 minutes

- Le calcul de la concentration s'effectue selon la formule suivante :

$$C = \frac{S_{\text{éch}} \times Z_{\text{std}}}{S_{\text{std}}} \times \frac{V}{m \text{ (ou } v)} \times \frac{V_{\text{ext}}}{V_a} \times \frac{V_1}{V_2}$$

C = concentration en matière active recherchée en $\mu\text{g/kg}$ ou $\mu\text{g/l}$ dans l'échantillon.

S éch = surface du pic de matière active recherchée dans l'échantillon

S std = surface du pic de matière active recherchée dans la solution étalon

Z std = concentration de matière active recherchée en $\mu\text{g/kg}$ dans la solution étalon.

V = volume en ml de solvant utilisé pour la reprise de l'extrait (2,8 ml)

m = masse en g d'échantillon analysé (15 g)

v = volume en ml d'échantillon analysé (10 ml)

V ext = volume en ml, de solvant à l'extraction (150 ml)

V a = volume en ml, d'aliquote prélevé après extraction (11ml)

V₁ = volume en ml, d'échantillon dilué pour la purification (22 ml)

V₂ = volume en ml, d'échantillon dilué réellement purifié sur la cartouche (20ml)

- La moyenne de contamination (X) est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{\sum x_i}{N} ; \quad x_i = \text{concentration de chaque échantillon (ppb)}$$

N = nombre d'échantillon

Σ = somme

Chapitre 3. Résultats d'analyse

1. Résultat de la Collecte des échantillons

Au total, 90 échantillons ont été collectés. Nous avons collectés 30 échantillons de piment, 30 échantillons de poivre et 30 échantillons de gingembre.

2. Résultat de la validation de la méthode

2.1. Exemple de chromatogramme

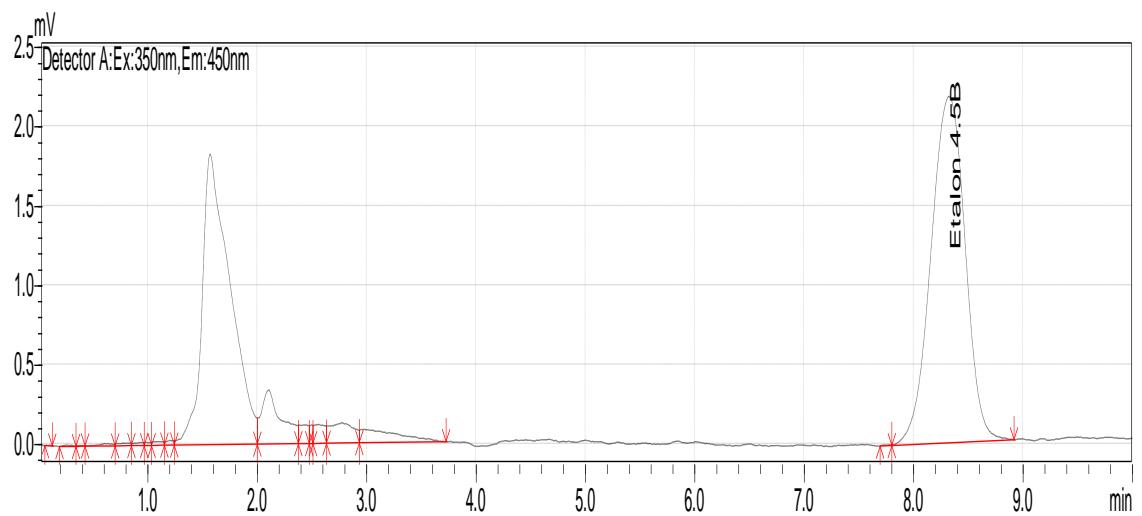


Figure 15 : Chromatogramme de l'étalon d'OTA

Chromatogramme de l'OTA du Piment N°24

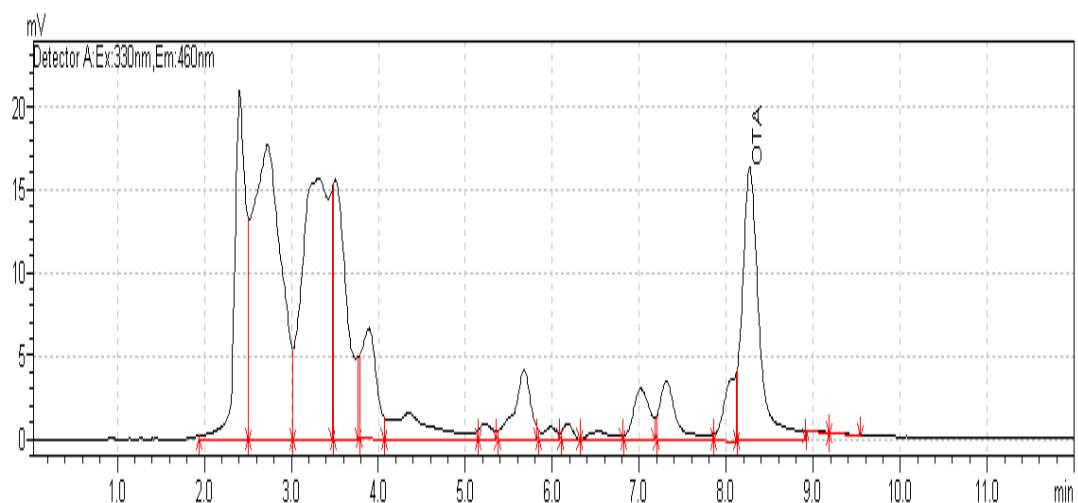


Figure 16 : Chromatogramme d'un échantillon contaminé

La figure 16 montre le chromatogramme d'un échantillon de piment contaminé
Le temps de rétention de l'OTA varie de 8 à 9 minutes.

2.2. Linéarité

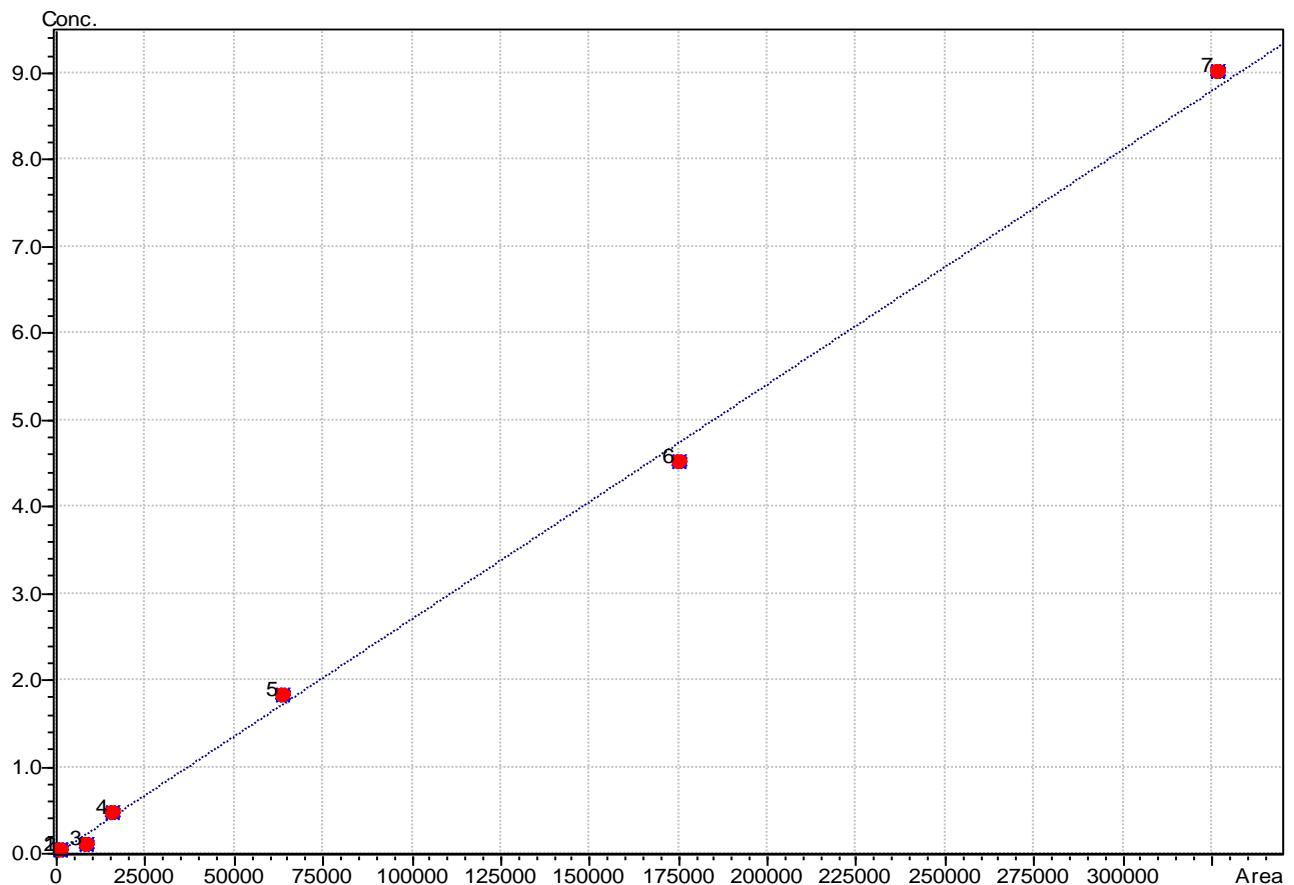


Figure 17 : linéarité de la solution d'OTA

La linéarité a été établie entre 0,018 à 9,0 $\mu\text{g/l}$, les autres paramètres de validation sont résumés dans le tableau ci-dessous

2.3. Autres paramètres de validation de la méthode d'analyse d'OTA

Tableau XIII : Les paramètres de validation de l'OTA

	Limite de détection (µg / kg)	Limite de quantification (µg / kg)	Justesse (%)	Fidélité (%)	Taux de récupération (%)
Epices (Gingembre, poivre et Piment)	0,004	0,012	2,091	11,24	86

Les paramètres suivants ont été évalués afin d'assurer la qualité de la méthode.

Les échantillons de piment et de gingembre présentent des traces d'OTA qui sont visibles dans les conditions de chromatographie utilisée

Le taux de récupération détermine l'efficacité de la méthode d'analyse, à l'échelle internationale il est recommandé que le taux de récupération accepté doit être situé entre 70 et 110%, notre taux de récupération est de 86% ce qui confirme que notre analyse a été effectuée dans de bonnes conditions

3. Niveau de contamination en µg/kg d'OTA dans le gingembre

Après l'injection, les graphiques sont intégrés pour déterminer la surface des graphiques et d'identifier le pic de l'OTA en fonction de celui de l'étalon de référence. Les calculs ont permis d'obtenir les valeurs mentionnées dans le tableau pour chaque échantillon.

Tableau XIV : Teneur en OTA dans les différents échantillons de gingembre

N° Ordre	OTA (µg/kg)	N° Ordre	OTA (µg/kg)
1	0,03	16	0.05
2	0,06	17	0.13
3	0,04	18	0.56
4	0,02	19	0.04
5	0,02	20	0.15
6	0,03	21	<LOD
7	0,01	22	0,02
8	0,04	23	0.03
9	0,11	24	0.18
10	0,01	25	<LOD
11	<LOD	26	0,47
12	0,03	27	0.54
13	0,01	28	0.25
14	0,03	29	0,25
15	<LOD	30	0,3

L'échantillon N° 18 est le plus contaminé avec une concentration de 0,56 µg/kg;
4 sur 30 échantillons ont des teneurs en OTA inférieur à la limite de détection.

4. Niveau de contamination moyenne en µg/kg d'OTA des échantillons de gingembre

Tableau XV : concentration moyenne en µg/kg d'OTA dans le gingembre

Echantillons			OTA (µg/kg)		
produit	total	positif	moyenne	médiane	étendue
Gingembre	30	26 (86,66%)	0,116	0,035	0-0,56

La contamination moyenne du gingembre est de 0,116 µg/kg, les concentrations varient de 0- 0,56 µg/kg ; 26 sur 30 échantillons sont positifs à l'OTA (86,66%)

5. Niveau de contamination en µg/kg d'OTA dans le piment

Tableau XVI : teneur en OTA dans les différents échantillons de piment

N° Ordre	OTA (µg/kg)	N° Ordre	OTA (µg/kg)
1	0,09	16	907,57
2	0,02	17	0,58
3	0,02	18	0,23
4	12,08	19	1,55
5	0,14	20	0,12
6	0,11	21	0,13
7	0,24	22	33,01
8	0,12	23	175,01
9	23,01	24	299,05
10	0,18	25	0,0042
11	2,05	26	0,03
12	154,48	27	0,0041
13	94,45	28	0,02
14	0,43	29	0,46
15	0,34	30	18,78

L'échantillon N° 16 est le plus contaminé avec une concentration de 907,57 µg/kg ; tous les échantillons de piment se sont révélés positifs à l'OTA

6. Contamination moyenne en µg/kg d'OTA dans le piment

Tableau XVII : concentration moyenne en µg/kg d'OTA dans le piment

Echantillons			OTA (µg/kg)		
produit	total	positif (pourcentage)	moyenne	médiane	étendue
piment	30	30(100%)	57,477	0,385	0,0041-907,57

Le tableau montre que le piment est fortement contaminé avec une contamination moyenne de 57,477 µg/kg, les concentrations varient de 0,0041-907,57 µg/kg tous les échantillons de piment sont positifs à l'OTA

7. Niveau de contamination en µg/kg dans le poivre

Aucune contamination n'a été détectée dans les échantillons de poivre. Toutes les valeurs étaient inférieures à la limite de détection (LOD)

8. Etude comparée des trois matrices

8.1. Moyennes de concentration des 3 groupes d'échantillons en OTA

La figure ci-dessous montre le graphique des moyennes des concentrations de chaque produit : le gingembre, le piment et le poivre qui sont respectivement 0,116, 57,477 et 0. Selon le test de fisher qui sert à comparer les moyennes et les variances de deux matrices, nous avons obtenus une valeur égale à 0,00064 qui est inférieure à 0,05. La valeur calculée étant inférieure à 0,05 cela signifie que la différence est significative

Les résultats montrent clairement que le piment est le plus contaminé contrairement au gingembre.

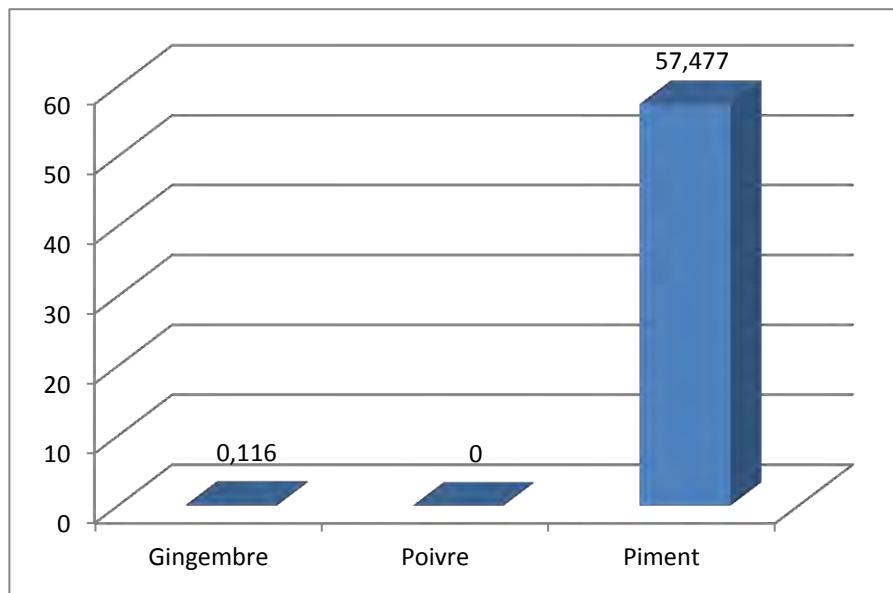


Figure 18 : Représentation des moyennes des concentrations en OTA des trois produits

8.2. Comparaison des teneurs obtenues par rapport aux normes

Nous avons reparti les différents types d'échantillons en fonction des normes fixées par l'union Européenne qui est de $30 \mu\text{g/kg}$ pour le piment et le poivre et $15 \mu\text{g/kg}$ pour le gingembre. Sur l'ensemble des échantillons, le piment est le plus contaminé on note 20% qui ont une concentration supérieure à $30 \mu\text{g/kg}$ et 80% des échantillons qui ont une teneur inférieure à $30 \mu\text{g/kg}$. Pour les deux autres produits aucun échantillon n'a une concentration supérieure à $30 \mu\text{g/kg}$ et $15 \mu\text{g/kg}$ respectivement pour le poivre et le gingembre. Tous les échantillons ont une concentration inférieure équivalente à un taux de 100%.

Tableau XVIII : Nombre d'échantillons en fonction des normes internationales

		Nombre d'échantillons	Pourcentage (%)
GINGEMBRE	Teneur>15µg/kg	0	0
	Teneur<15µg/kg	30	100
PIMENT	Teneur>30µg/kg	6	20
	Teneur<30µg/kg	24	80
POIVRE	Teneur>30µg/kg	0	0
	Teneur<30 µg/Kg	30	100

Chapitre 4. Discussion et recommandations

1. Discussion

Les épices sont très utilisées dans la cuisine ivoirienne surtout pour la conservation et la saveur qu'elles apportent aux repas. Cependant, en raison de leur traitement et des conditions environnementales, les épices peuvent constituer une source de mycotoxines et éventuellement porter atteinte à la santé du consommateur.

C'est dans ce but, que notre travail a porté sur la détermination du niveau de contamination de l'OTA dans trois épices (gingembre, piment et poivre)

A) Ochratoxine A dans le poivre

Nous avons prélevés 30 échantillons de poivre, tous les échantillons de poivre se sont révélés négatifs à l'OTA soit un pourcentage de (100%).

Il y a peu d'études concernant l'incidence de l'OTA dans le poivre noir dans la littérature et notamment en Côte d'Ivoire

Nos résultats concordent avec ceux de Goryacheva et al (2006), Fazekas et al (2005) qui n'ont détectés aucune teneur en OTA dans les échantillons de poivre noir. Par contre Fatih O. et al, (2012) en Turquie ont rapportés 17,4% de contamination des échantillons de poudre de poivre par l'OTA, dont les teneurs, toutes en dessous de la limite admissible de 30 µg/kg variaient de 0,87 à 3,48 µg/kg avec une concentration moyenne de 1,82 µg/kg. Thirumala-Devi et al (2001) en Inde, Jalili.M et al (2010) en Malaisie ont également rapporté des teneurs variables en OTA dans les échantillons de poivre

B) Ochratoxine A dans le gingembre

L'analyse des 30 échantillons de gingembre a révélé que 26 échantillons étaient positifs à l'OTA soit 86,6%. Les teneurs variaient de 0 à 0,56 µg/kg avec un taux moyen de 0,116 µg/kg, Seul 4 des 30 échantillons soit 13,33% se sont

révélés négatifs à l'OTA. Les teneurs trouvées sont bien en dessous de la limite permise par l'UE qui est de 15 µg/kg.

Nos résultats montrent une très faible fréquence de contamination de nos échantillons de gingembre et corroborent ceux de Thirumala et al (2001) qui ont trouvés des taux d'OTA variant de 11 à 102 µg/kg dans les échantillons de gingembre en provenance d'Inde par contre Goryacheva et al (2006) n'ont rapportés aucune contamination dans les échantillons de gingembre analysés

C) Ochratoxine A dans le piment

En ce qui concerne le piment, tous les échantillons analysés étaient contaminés par l'OTA (100%). Les teneurs trouvées variaient de 0,0041 à 907,57 µg/kg avec un taux moyen de 57,47 µg/kg

Nos résultats corroborent avec ceux de différents auteurs tels que Fazekas et al, (2005), Saha et al (2007), santos.L et al, (2010) qui ont rapportés la contamination de l'OTA dans les échantillons de piment analysés. Thirumala-Devi et al (2001) ont aussi montré la contamination des échantillons d'épice les plus utilisés en cuisine indienne par l'OTA avec des concentrations variant entre 15 et 102 µg/kg. En Turquie, la contamination par l'OTA était de 75% ou 4 d'entre eux avaient des niveaux supérieurs aux limites réglementaires établies dans la législation européenne (30 µg/kg). Les concentrations allaient de 0,46 à 53,04 µg/kg. Iffat T. et al, (2011) ont aussi rapportés des résultats positifs à l'OTA (80%) avec des concentrations allant de 23 à 94 ng/g

D) OTA dans les épices en fonction des normes

Les pays ont mis en place de nombreux règlements pour les mycotoxines dans les denrées alimentaires, en raison du danger qu'elles peuvent entraîner sur la santé de l'homme. L'Union Européenne a fixé des teneurs maximales pour l'OTA dans les épices. La Commission européenne a établi une limite de 30

$\mu\text{g/kg}$ pour les piments, le poivre et $15 \mu\text{g/kg}$ pour le gingembre (règlement № 105/2010).

Lors de notre analyse, aucune contamination n'a été observée dans le poivre, par contre les résultats trouvés en général dans les échantillons de piment et de gingembre sont faibles et nettement inférieurs aux seuils autorisés à l'exception de 6 échantillons de piment (20%) qui se sont révélés très contaminés avec des niveaux d'OTA très élevés dépassant la valeur limite de $30 \mu\text{g/kg}$ fixée par l'Union Européenne pour l'OTA et dans un cas atteignait 30 fois la quantité autorisée ($907,57 \mu\text{g/kg}$).

La contamination du piment et du gingembre par l'OTA peut être due aux conditions environnementales et de conservation (humidité et température élevée mais également aux mauvaises pratiques agricoles, aux pratiques médiocres d'entreposage, à un séchage lent ou au cours d'un stockage prolongé. Il faut signaler que pour le gingembre, la contamination a pu avoir lieu lors des conditions de traitement et de transformation car l'analyse s'est effectuée sur les pastilles de gingembre commercialisé par les vendeurs ambulants. Le piment est généralement récolté à la main, une mauvaise manipulation rend plus vulnérable le piment à la contamination. Les échantillons de piment étaient vendus dans des bassines ou des paniers en vrac au marché sans emballage exposé à un environnement chaud et humide. L'absence d'OTA dans le poivre peut s'expliquer par de bonne condition de conservation et de stockage.

Au terme de notre étude, nous avons remarqués que plus de la moitié des épices analysées ont montré une contamination par l'OTA (62,22%). Ces résultats sont particulièrement rassurants pour le poivre où aucune teneur en OTA n'a été détectée (100%). Par contre, le piment s'est révélé être l'épice le plus contaminé

Pour cette raison, les épices doivent être lavés et triés après la récolte ce qui permet de séparer les grains abîmés. Les mauvaises conditions de conservation, l'absence de contrôles de routine par les autorités des denrées alimentaires

vendues sur les marchés, conditionnent les teneurs élevées en OTA. Sangaré et al (2006) dans une étude préliminaire sur les denrées alimentaires vendues sur les marchés d'Abidjan avaient rapportés des taux moyens très élevés dans les aliments suivants : le mil ($110,5 \mu\text{g}/\text{kg}$), le riz ($50,5 \mu\text{g}/\text{kg}$), le maïs ($870,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) et les arachides ($35 \mu\text{g}/\text{kg}$). Il est possible de minimiser la contamination en prenant des précautions au niveau de l'entreposage et la manutention des récoltes après la moisson et en inspectant rigoureusement les produits avant la mise sur le marché. La réduction des mycotoxines relève à la fois du rôle des agriculteurs, des commerçants et des industriels.

La présence de l'OTA dans les épices doit mettre en relief le besoin d'établir des actions réglementaire et des plans de contrôle et de surveillance pour les mycotoxines afin de réduire leur présence au niveau de la chaîne alimentaire.

Toutefois, éduquer les consommateurs est une étape importante comme l'indique l'augmentation des intoxications dans les pays en voie de développements ou les mesures d'hygiène et les contrôles de qualité ne sont pas toujours appliqués ou même minimiser.

La plupart des toxi-infections est causée par une mauvaise conservation et souvent une cuisson insuffisante des aliments. Aussi, la mise en place d'un programme d'éducation sur les risques de contamination par les mycotoxines serait profitable à toute la population.

2. Recommandations

La production classique d'épices implique un certain nombre de problèmes d'hygiène qui peuvent présenter des risques considérables pour les producteurs et les consommateurs. De plus la qualité des aliments, peuvent également être affectés. Face à cette situation, les producteurs et surtout l'état devraient prendre compte des conduites à tenir afin de réduire les risques de contamination des mycotoxines dans les aliments

➤ Avant la récolte

- utiliser les insecticides et les fongicides homologués contre les ravageurs des épices.
- application appropriée d'herbicide contre les mauvaises herbes ou procéder au sarclage des mauvaises herbes dans la culture
- Eviter de provoquer des dégâts mécaniques aux plantes pendant le cycle de culture.
- faire une bonne irrigation des parcelles
- récolter les épices lorsqu'elles sont arrivées à pleine maturité
- Avant la récolte, s'assurer que le matériel est bien nettoyé et fonctionnel pour s'assurer que les épices ne soient pas contaminé lors de la récolte par les mycotoxines

➤ Récolte

- S'assurer que Les récipients de conditionnement et les lieux d'entreposage sont propres et exempts de toute contamination
- éviter de causer des dégats mécaniques sur les épices pendant la récolte
- il faut faire sécher les épices jusqu'à un taux d'humidité très bas (généralement moins de 15 %).
- Il faut nettoyer les épices récemment récoltées afin d'enlever les grains endommagés et d'autres matières étrangères

➤ Entreposage

- Eviter d'empiler ou d'entasser des produits avant le séchage
- Il faut s'assurer que les installations d'entreposage comprennent des structures sèches, bien ventilées qui fournissent une protection contre les pluies, un drainage des eaux souterraines, une protection contre l'entrée des rongeurs et des oiseaux, et des fluctuations minimales de température.
- trier les épices pour enlever les matières étrangères
- utiliser un agent de conservation approprié pour lutter contre les ravageurs ou moisissures pendant la conservation.
- Décrire toutes les phases de la production et de stockage
- Transport depuis l'entreposage
- Il faut protéger les épices séchées contre la reprise d'humidité pendant la conservation et le transport.

CONCLUSION

La contamination de l'ochratoxine A dans les denrées alimentaires en particulier dans les épices destinés à la consommation peuvent altérer la qualité marchande des produits contaminés entraînant des pertes économiques. Leur présence peut constituer un danger potentiel pour la santé des populations. En effet, l'ochratoxine A est à l'origine de néphrotoxicité et de cancers. Il est aussi immunotoxique, hépatotoxique et tératogène. Elle peut entraîner à forte dose des intoxications alimentaires.

Fort de ce constat, le but de notre travail était de déterminer le niveau de l'Ochratoxine A dans les épices (le gingembre, le piment et le poivre) denrées de plus en plus consommées par les populations ivoiriennes surtout en cuisine.

Il s'agissait de :

- Déterminer les teneurs en OTA dans les différents échantillons d'épices collectés (gingembre, piment et poivre)
- Déterminer la teneur moyenne d'OTA dans les différents échantillons d'épices
- Comparer les valeurs obtenues aux normes établies par la législation internationale.

Notre travail s'est déroulé dans les différentes communes d'Abidjan où nous avons prélevé 90 échantillons d'épices, 30 échantillons de gingembre, 30 échantillons de piment et 30 échantillons de poivre, les prélèvements ont par la suite été acheminés au laboratoire central d'Agrochimie et d'Ecotoxicologie d'Abidjan pour analyse par la méthode HPLC munie d'un détecteur fluorimétrique.

Les résultats ont montré que 86,66% des échantillons de gingembre sont contaminés, quant au piment ce taux est de 100% avec des teneurs variant respectivement de 0,01 à 0,56 µg/kg et de 0,0041 à 907,57 µg/kg. Par contre, aucune contamination n'a été détectée dans les échantillons de poivre. 20% des

échantillons de piment ont dépassé les limites maximales fixées par la réglementation européenne qui est de 30 µg /kg.

La population ivoirienne n'est pas à l'abri du danger du fait de la présence de l'OTA dans les épices en particulier dans le piment.

Les taux observés lors de cette étude ne représentent pas le niveau de contamination national mais peuvent être un signe d'alerte pour les populations ivoiriennes. Il serait très important que les campagnes d'information s'adressent particulièrement aux populations les plus vulnérables, il faudrait établir un bilan de connaissance sur la contamination des épices par l'OTA et le renforcement du contrôle des épices au niveau des autorités nationales, ainsi que les producteurs et les organisations de défense des droits des consommateurs.

La contamination des épices par l'OTA ne devraient pas être sous-estimée, En conclusion, Les résultats que nous avons trouvés doivent constituer un ensemble de données pour la fixation de normes sur les épices en côte d'ivoire et la protection des consommateurs ivoiriens sur d'éventuels effets toxiques associés aux mycotoxines et susciter davantage de vigilance

Il faudrait étendre l'étude sur d'autres mycotoxines (les aflatoxines, trichocethènes) sur l'ensemble du territoire et mettre en place une stratégie de prévention de la contamination notamment du piment et encourager la poursuite de ce travail

BIBLIOGRAPHIE

ABDELLAH.Z

Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des fermentations traditionnelles

Th. Bio: Fes, Université Sidi Mohammed Abdellah, 2004, 63

ABRAMSON D.

Measurement of ochratoxin A in barley extracts by liquid chromatography-Mass spectrometry.

Journal of chromatography, 1987, 391, pp 315-320.

ALBASSAM M. A., YONG S. L., BHATNAGAR R., SHAMAR A. K.,

PRIOR M.G.

Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of Ochratoxin A in rats.

Vet. Pathol., 1987, 24, pp 427-435.

ARORA R.G., FRÖLEN H.

Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. II.

Ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of gestation

Acta Vet. Scand., 1981, 22, pp 535-538.

ASHBY J., DE SERRES F.J., SHELBY M.

Evaluation of short-term tests for carcinogens.

Cambridge University press., 1988.

ATOUI.K.A.

Approche de la mycotoxicogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: étude moléculaire et physiologique

Th. Institut National Polytechnique de Toulouse, 2006, 34

AUFFRAY Y., & BOUTIBONNES P.

Evaluation of the genotoxic activity of some mycotoxins using E.coli in the SOS spot test.

Mutat. Res., 1986, 171, pp 79-82.

AUSTWICK P.K.C.

Balkan nephropathy.

The Practitioner, 1981, 255, pp1031-1038.

BALLINGER M.B., PHILLIPS T.D. & KUBEDA L.F.

Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the Pregnant rat.

J. Food Safety, 1986, 8, pp 11-24.

BARNIKOL H., THALMAN A.

Clinical observation in the pig in relation to the mycotoxins ochratoxin A and Zearalenone.

Tierärztl. Umsch., 43 : 74-82.

BARTOS J., MATYAS Z.

Testing the screening method for assaying ochratoxin in grains.

Vet. Med., 1980, 25, pp 635-639.

BAUER J., GAREIS M.

Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette.

Veterinärmed., 1987, 34, pp 613-627.

**BENDELE A.M., NEAL S.B., OBERLY T.J., THOMSON C.Z.,
BEWSEY B.J., HILL L.E., REXROAT M.A.**

Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacteria and mammalian cell assays.

Food. Chem. Toxicol., 1985a, 23, pp 911-918.

BERNDT W.O., HAYES A.W.

In vivo and in vitro changes in renal functions caused by ochratoxin A in the rat.

Toxicology, 1979, 12, pp 5-17.

BETINA V.

Bioactive secondary metabolite of microorganisms.

Progress in industrial microbiology. Elsevier. 1994.

BOORMAN G., HONG H.L., DIETER M.P., HAYES H.T., POHLAND A.E., STACK M. & LUSTER M.I.

Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A
Tox. Appl. Pharm., 1984, 72, 304-312.

BOSE S., SINHA S.P.

Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C.

Food and chemical Toxicology, 1994, 32, 533-537.

BRAUNBERG R.C., BARTON C.N., GANTT O.O., FRIEDMAN L.

Interaction of citrinin and ochratoxin A.

Nat. Toxins, 1994, 2, pp 124-131.

BROWN M.H., SZCZECH G.M., PURMALIS B.P.

Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats.

Toxicology Applied Pharmacology, 1976, 37, pp 331-338.

BRUININK A., RASONYI T., SIDLER C.

Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization.

In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell culture.

Toxicology, 1997, 118, 205-210.

BUNGE I., DIRHEIMER G., RÖSCHENTHALER R.

In vitro and in vivo inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, 83, pp 398-405.

BUNGE I., HELLER K., RÖSCHENTHALER R.

Isolation and purification of ochratoxin A.

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1979, 168, pp 457-458.

CANDLISH A.A.G., STIMSON W.H., SMITH J.E.

Determination of ochratoxin A by monoclonal antibody-based enzyme immunoassay.

J. Assoc. Offc. Anal. Chem., 1988, 71, pp 961-964.

CASTEGNARO M., BAREK J., FREMY J.M., LAFONTAINE M.,

MIRAGLIA M., SANSONE E.B. & TELLING G.M., Eds.

Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some Mycotoxins. IARC Scientific Publications.

International Agency for Research on cancer, Lyon, 1991, 113, pp 63.

CASTEGNARO M., BARTSCH H., CHERNOZEMSKY I.

Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans cancer.

Res., 1987, 47, pp 3608-3609.

CASTEGNARO M., PFOHL-LESZKOWICZ A.

Les mycotoxines : contaminant omniprésents dans l'alimentation animal Et humaine

In : Sécurité alimentaire du consommateur.

Ed : Manfred Moll et Nicole Moll

Eds Tech. et DOC., 2001, 2, pp 127-179.

CASTEGNARO M., WILD C.P.

IARC activities in mycotoxin research.

Natural toxins, 1995, 3, pp 327-331.

Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl-Leszkowicz, A., Esteve, J., Steinmann, J., Tillmann, T., Michelon, J., and Bartsch, H.

Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction

International Journal Of Cancer.Journal International Du Cancer, 1998.

77, 70-75.

CHELKOWSKI J., SZEBIOTKO K., GOLINSKI P., BUCHOWSKI M., GODLEWSKA B., RADOMYSKA W., WIEWIOROWSKA M.

Mycotoxins in cereals grain. 5 . Changes of cereal grain biological value After ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation.

Nahrung, 1982, 26, pp 1-7.

CHONG X., RAHIMTULA A.D.

Alterations in ATP-dependent calcium uptake by rat renal cortex microsomes following ochratoxin A administration in vivo or addition in Vitro.
Biochemical Pharmacology, 1992, 44, 1401-1409.

CHU F.S., CHANG C.C., ASHOOR S., PRENTICE N.

Stability of ochratoxin B1 and ochratoxin A in brewing.

Appl. And Environ. Microbiol., 1975, 29, pp 313-316.

CLAVEL J.P., EMERIT J., THUILLIER A.

Lipidoperoxydation et radicaux libres. Rôle en biologie cellulaire et en Pathologie.

Path. Biol., 1985, 33, pp 61-69.

COKER R.D.

Mycotoxins and their control : constraints and opportunities.

NRI bulletin 79, Chatham, UK: Natural Resources Institute. 1997.

COULIBALY.A., DEMBELE.A., GODI.B.H.M., SILUE.N., TOURE.A.

Evolution of the merchantability and the level of ochratoxin A of Ivorian Cocoa beans from production areas during the harvest season

Sustainable agriculture research, 2012, vol 1, NO. 2

CREPPY E.E., BETBEDER A.M., GHARBI A., COUNORD J.,

CASTEGNARO M., BARTSCH H., MONCHARMONT P., FOUILLET B., CHAMBON P., DIRHEIMER G.

Human ochratoxicosis in France.

In : Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Renal tumors.

Ed : M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. Chernozemsky and H. Bartsch.

Lyon, IARC Scientific publication, 1991, 115, pp 1-7.

**CREPPY E.E., CASTEGNARO M., GROSSE Y., MERIAUX J.,
MANIER C., MONCHARMONT P., WALLER C.**

Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France : Alsace,
Aquitaine, Rhône-Alpes.

In : Human ochratoxicosis and its pathologies

Ed : E.E. Creppy, M. Castegnaro, G. Dirheimer

John Libbey Eurotext INSERM, 1993, 231, pp 147-158.

CREPPY E.E., CHAKOR K., FISHER M.J., DIRHEIMER G.

The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase
In isolated rat hepatocytes and in vivo.

Archives of Toxicology, 1990, 64, 279-284.

CREPPY E.E., KANE A., GIJESSEN-CROUSE E., ROTH A.,

RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.

Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis
MDCK cells.

Arch. Toxicol. Suppl., 1986, 9, pp 310-314.

**CREPPY E.E., KANE A., DIRHEIMER G., LAFARGE-FRAYSSINET
C., MOUSSET S., FRAYSSINET C.**

Genotoxicity of ochratoxin A in mice : DNA single-strand break
Evaluation in spleen, liver and kidney.

Toxicology Letters, 1985, 28, pp 29-35.

**CREPPY E.E., KERN D., STEYN P.S., VLEGGAAAR R.,
RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.**

Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells.

Toxicology Letters, 1983, 19, pp 217-224.

**CREPPY E.E., LAFARGE-FRAYSSINET C., RÖSCHENTHALER R.,
DIRHEIMER G.**

Lymphocytes spléniques et effets immunosuppresseurs de l'ochratoxine A.
3^{ème} Ecole Internationale de Biologie Moléculaire, Alger, Office des Publications Universitaires, 1982b, 1, pp 91-94.

**CREPPY E.E., LUGNIER A.A., BECK G., RÖSCHENTHALER R.,
DIRHEIMER G.**

Action of ochratoxin A on cultured hepatoma cells. Revision of inhibition by phenylalanine.

FEBS Letters, 1979b, 104, pp 287-290.

**CREPPY E.E., LUGNIER A.A., FASIOLO F., HELLER K.,
RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.**

In vivo inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A.
Chem. Biol. Interact., 1979a, 24, pp257-262.

CREPPY E.E., RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.

Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine.

Food Chem. Toxicol., 1984, 22, pp 883-886.

CREPPY E.E., SCHLEGEL M., RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.

Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells.

Toxicology Letters, 1980a, 5, pp375-380.

CREPPY E.E., STORMER F.C., KERN D., RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.

Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and in vitro protein synthesis of hepatoma cells.

Chem. Biol. Interact., 1983b, 47, pp 239-247.

CREPPY E.E., STORMER F.C., RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G

Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-hydroxyochratoxin A and ochratoxin α on immune reponse in mice.

Infection and immunity, 1983a, 39, pp 1015-1018.

CUERO R.G., SMITH J.E., LACEY J.

Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains.

Trans. Brit. Mycol. Soc., 1987, 89, pp 221-226.

DEBERGHES P., BETBEDER A.M., BOISARD F., BLANC R., DELABY J.F., KRIVOBOK S., STEIMAN R., SEIGLE-MURANDI F., CREPPY E.E.

Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: physical and chemicals Methods.

Mycotoxin Research, 1995, 11, pp 37-47.

DEKANT W., VAN VAKAS S.

Bioactivation of nephrotoxic halo-alkenes by glutathione conjugation:
Formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate
 β -iyase.

Drug Metabolism reviews, 1980, 20, pp 43-83.

**DEMBELE.A, COULIBALY.A, TRAORE.S.K, MAMADOU.K, SILUE.N,
TOURE ABBA.A.**

Détermination du niveau de contamination de l'OTA dans les fèves de
Cacao à l'exportation

Tropicultura, 2009, 27,1, 26-30

**DI PAOLO N., GUANIERI A., GAROSI G., SACCHI G.,
MANGLIAROTTI A.M., DI PAOLO M.**

Inhaled mycotoxins lead to acute failure.

Nephrot. Dial. Transplant (suppl.4),1994, 9, pp 116-120.

**DI PAOLO N., GUANIERI A., LOI F., SACCHI G.,
MANGLIAROTTI A.M., DI PAOLO M.**

Acute renal failure from inhalation of mycotoxins.

Nephron, 1993, 64, pp 621-625.

DWIVEDI P., BURNS R.B.

Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks.

Res. Vet. Sci., 1984, 36, pp 117-121.

DWIVEDI P., BURNS R.B.

The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry:

Worlds Poult. Sci. J., 1986, 42, pp 32-47.

EL-DESSOUKI S.

Ochratoxin A in Bier.

Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 1992, 11, pp 354-355.

ELLING F., HALD B., JACOBSEN C., KROGH P.

Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A.

Acta Pathologica and Microbiologica Scandinavica.

Section A, Pathology, 1975, 83, pp 739-741.

ELLING F., MOLLER T.E.

Mycotoxin nephropathy in pigs.

Bull.W.H.O., 1974, 49, pp 411-448.

ELLING F., NIELSEN J.P., LILLEHOJ E.B., THOMASEN M.S.,

STORMER F.C.

Ochratoxin A induced porcine nephropathy : enzyme and ultra-structure

Changes after short-term exposure.

Toxicon, 1985, 23, pp 247-254.

ENTWISLE.A.C., WILLIAMS.A.C., MANN.P.J., SLACK.P.T.,

GILBERT.J.

Liquid chromatographic method with immunoaffinity column

Cleanup for determination of ochratoxin A in barley : collaborative

study

Journal of AOAC international, 2000, 1377-83

ESTERBAUER H.

Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.

J. Clin. Nutr., 1993, 57, pp 779s-786s.

FATIH OZBEY, BULENT KABAK

Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices

Food control 2012, 28, 354-361.

FAO (Food and agriculture organization of the United Nations) (2004)

Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003

FAO food and nutrition paper 81 FAO, Rome

FAOSTAT/WHO

Production des épices, 2003-2004

FAZEKAS, B., TAR, A., & KOVÁCZ, M.

Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary.

Food Additives and Contaminants, 2005, 22, 856-863.

FÖLLMANN W., HILLEBRAND I.E., CREPPY E.E., BOLT H.M.

Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and alpha.

Archives of toxicology, 1995, 69, pp 280-286.

FUCHS R., RADIC B., CEOVIC S., SOSTARIC B., HULT K.

Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats.

Period. Biol., 1988b, 90, pp 39-42.

FUKUI Y., HAYASAKA I., ITOH M., TAKEUCHI Y.

Development of neurons and synapses in ochratoxin A induced microcephalic mice: a quantitative assessment of somatosensory cortex..

Neurotoxicology and Teratology, 1992, 14, pp 191-196.

**FUKUI Y., HOSHINO K., KAMEYAMA Y., YASUI T., TODA C.,
NAGANO H.**

Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain.

Food Chem. Toxicol., 1987a, 25, pp 17-24.

GALTIER P.

Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal – II Distribution tissulaire et élimination chez le rat.

Ann. Rech. Vétér., 1974b, 5, pp 319-328.

GALTIER P., ALVINERIE M., CHARPENTEAU J.L.

The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens.

Food and Cosmetics Toxicology, 1981, 19, pp 735-738.

GALTIER P., CHARPENTEAU J.L., ALVINERIE M. & LABOUCHE C

The pharmacokinetic profile of ochratoxin A after oral and intravenous administration.

Drug Metabolism and Disposition, 1979b, 7, pp 429-434.

GALTIER P., JEMMALI M., LARRIEU G.

Enquête sur la présence éventuelle d'aflatoxines et d'ochratoxine A dans le Maïs en France en 1973 et 1974.

Ann. Nutr. Aliment., 1977, 31, pp 381-389.

GAREIS M.

Fate of ochratoxin A on processing of meat products.

Food Additives and Contaminants, 1996, 13, pp 35-37.

GILIANI S.H., BANCROFT J., REILY M.

Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos.

Toxicology and Applied Pharmacology, 1978, 46, pp 543-546.

GOLDBLATT L.A.

In Aflatoxin, Academic Press. New York, 1969, 13-46, pp 223-224.

**GORYACHEVA, I. Y., DE SAEGER, S., LOBEAU, M., EREMIN, S. A.,
BARNA-VETRÓ, I., & VAN PETEGHEM, C.**

Approach for ochratoxin A fast screening in spices using clean-up tandem immunoassay columns with confirmation by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

Analytica Chimica Acta, 2006, 577, 38-45.

GRIMALDI.J., SADOUX.F.S.

Le poivrier

Ministère de l'agriculture du Cameroun, 1985

**GROSSE Y., MONJE M.C., MACE K., PFEIFER A & PFOHL-
LESZKOWICZ A.**

Use of bronchial epithelial cells expressing human cytochrome P450
For study on metabolism and genotoxicity of ochratoxin A.

In vitro Toxicology, 1997b, 10, pp 93-102.

**HADIANE R., ROGER-REGNAULT C., BOUATTOUR H., ELLOUZE
F., DIRHEIMER G.**

Isolation and determination of natural analogues of the mycotoxin
ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*.

Toxicology, 1992, 76, pp 233-243.

HAGELBERG S., HULT K., FUCHS R.

Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties.

Journal of Applied Toxicology: JAT, 1989, 9, pp 91-96.

HANSEN C.E., DUELAND S., DREVON C.A., STORMER F.C.

Metabolism of ochratoxin A by primary cultures of rat hepatocytes.

Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43, pp 1267-1271.

HARVEY B.B., ELISSALDE M.H., KUBENA L.F., WEAVER E.A. & CORRIER DE CLERMANT B.A.

Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts.

Am. J. Vet. Res., 1992, 53, pp 1966-1970.

HARWIG J., CHEN Y.K., COLLINGS-THOMPSON D.L.

Stability of ochratoxin A in beans during canning.

J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 1974, 7, pp 288-289.

HARWIG J., KUIPER-GOODMAN T. & SCOTT P.M.

Microbial food toxicants : Ochratoxins.

In : *Handbook of Foodborne Disease of Biological Origin*

Ed : M. Recheigl

Boca Raton, CRC Press, FL. USA, 1983, pp 193-238.

HAUBECK H.D., LORKOWSKI G., KOLSCH E.,

RÖSCENTHALER R.

Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine.

Appl. And Environ. Microbiol., 1981, 41, pp 1040-1042.

HAYES A.W., HOOD R.D., LEE H.L.

Teratogenic effects of ochratoxin A in mice.

Teratology, 1974, 9, pp 93-97.

HENNIG A., FINK-GREMMELS J. & LEISTNER L.

Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours. Ed : Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H.

Lyon, IARC scientific publication, 1991, 115, pp 255-260.

HIETANEN E., MALAVEILLE C., CAMUS A.M., BEREZIAT J.C.,

BRUN G., CASTEGNARO M., MICHELON J., IDLE J.R., BARTSCH H.

Interstrain comparison of hepatic and renal microsomal carcinogen metabolism and liver S9-mediated metabolizes to debrisoquine.

Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals, 1986, 14 pp 118-126.

HOLMBERG,T.,BREITHOLTZ-EMANUELSON,A.,HAGGBLOM,P.;

SCHAN, O. and HULT, K.

Penicillium verrucosum in feed of ochratoxin A positive swine herbs

Mycopathologia, 116, 169-176, 1991

HULT K., HÖKBY E., GATENBECK S. & RUTQVIST L.

Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden, use in evaluation of toxin content of consumed feed.

Appl. Environ. Microbiol., 1980, 39, pp 828-830.

HULT K., GATENBECK S.

A spectrophotometric procedure, using carboxypeptidase A, for ochratoxin A quantification.

J. Assoc. Offc. Anal. Chem., 1976, 59, pp 128-129.

HULT K., PLESTINA R., HABAZIN-NOVAK V., RADIC B., CEOVIC S.

Ochratoxin A in human blood and Balkan Endemic Nephropathy.

Arch. Toxicol., 1982, 51, pp 313-321.

HULT K., RUTQVIST L., HOLMBERG T., THAFVELIN B. & GATENBECK S.

Ochratoxin in blood of slaughter pigs.

Nordisk Veterinaermedicin, 1984, 36, pp 314-316.

IARC (International Agency for Research on Cancer)

Analytical method I-thin-layer chromatographic determination of Ochratoxin A in foodstuff. In: Environmental Carcinogens: Selected Methods of Analysis. Vol.5, some mycotoxins. Ed: H. Egan, L. Stoloff, M. Castegnaro, P.Scott, I.K O'Neil, H. Bartsch, and W. Davis.

International Agency for Research on Cancer, 1982, pp 255-270.

IARC

Ochratoxin A in: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic Risks of chemical to humans Some naturally-occurring substances: Food items and constituents 1993

**IFFAT TAHIRA, SALMA KHATOON, NAFEESA QUDSIA HANIF AND
NIGHAT SULTANA**

Method Optimization and Determination of Ochratoxin A in Red Chilli
(*Capsicum annuum L.*) *Romer Labs, Rawalpindi, Pakistan.*

PMAS-Arid Agriculture University, Rawalpindi, Pakistan. 2011

II'ICHEV Y.V., PERRY J.L., RUKER F., DOCKAL M., SIMON J.D.

Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Binding sites localized by competitive interactions with the native protein and its recombinant fragments.

Chemico-Biological Interactions, 2002a, 141, pp 275-293.

JAKOBY W.B. & HABIG W.H.

Glutathione transferases. In: Enzymatic Basis of Detoxification.

Ed: W.B. Jakoby.

Orlando, FL, Academic Press, 1980, 2, pp 63-94.

JALILI, M., JINAP, S., & RADU, S.

Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial black and white pepper products.

Mycopathologia, 2010, 170, 251-258

JIAO Y., BLAAS W., RÜHL C., WEER R.

Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry.

Journal of Chromatography, 1992, 595, pp 364-367.

JECFA, WHO

Evaluation of certain mycotoxins. Fifty-Sixth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 906. 2002.

JORGENSEN K.

Survey of pork, poultry, coffee, bier and pulses for ochratoxin A.

Food Addit. Contam., 1998, 5, pp 550-554.

KANE A.

Intoxication subchronique par l'ochratoxine A, mycotoxine contaminant les aliments : effets néphrotoxiques et génotoxiques.

Thèse de Doctorat de l'Université LOUIS Pasteur Strasbourg., 1986

KANE A., CREPPY E. E., RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.

Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats.

Toxicology, 1986 a, 42, pp 233-243.

KANISAWA M.

Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice.

Dev. Food Sci., 1984, 7, pp 245-254.

KANISAWA M., SUZUKI H.

The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats.

JEPTO, 1990, 10, pp 56-63.

KROGH P.

Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy.

Nord. Vet. Med., 1976, 28, pp 452-458.

KROGH P.

Ochratoxins A in food. In: Mycotoxin in food Ed: P. Krogh

New York, Academic press, 1987, pp 97-127.

KROGH P., AXELSEN N. H., ELLING F., GYRD-HANSEN N., HALD B., HYLDGAAD-JENSEN J., LARSEN A. E., MADSEN A., MORTENSEN H. P., MOLLER T., PETERSEN O. K., RAVNSKOV U., ROSTGAARD M., AALUND O.

Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A – contaminated feed.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1974, 246, pp 1-21.

KROGH P., ELLING F., FRIIS C., HALD B., LARSEN A. E., LILLEHOJ E. B., MADSEN A., MORTENSEN H. P., RASMUSSEN F., RAVNSKOV U.

Porcine nephropathy induced by long term ingestion of ochratoxin A.

Vet. Pathol., 1979, 16, pp 466-475.

KROGH P., GYRD-HANSEN N., HALD B., LARSEN S., NIELSEN J.P., SMITH N., IVANOFF C., MEISNER H.

Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A induced porcine nephropathy: Diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity.

J. Toxicol. Environ. Health, 1988, 23, pp 1-14.

KROGH P., HALD B., PEDERSEN E. J.

Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxicporcine nephropathy.

Acta Pathologica Et microbiologica Scandinavica.

Section B: Microbiology and Immunology, 1973, 81, pp 689-695.

KUIPER GOODMAN T., OMINSKI K., MARQUARDT R. R.

MALCOLM S., Mc MULLEN E., LOMBAERT G. A., MORTON T.

Estimating human exposure to ochratoxin A in Canada

In : Human Ochratoxidosis and its Pathologies

Ed : E. E. Creppy, M. Castegnaro, G. Dirheimer.

John Libbey Eurotext INSERM., 1993, 213, pp 167-174.

KUMAGAIS S., AIBARA K.

Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in rat

Toxicology and Applied pharmacology, 1982, 64, pp 94-102.

KUMARI D., SINHA S. P.

Effect of retinol on ochratoxin produced genotoxicity in mice.

Food Chem. Toxicol., 1994, 32, pp 471-475.

L. SANTOS, S. MARIN, V. SANCHIS, A.J. RAMOS

Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Capsicum powder samples available on the Spanish market

Food Chemistry 2010, 122, 826–830

LEA T., STEIEN K., STORMER C.

Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression.

Mycopathologia, 1989, 107, pp 153-159.

LINDENFELSER L. A., CIEGLER A.

Solid substrate fermentor for ochratoxin A production.

Appl. And Environ. microbiol., 1975, 29, pp 323-327.

LUSTER M. I., GERMOLEC D. R., BURLESON G. R., JAMESON C. W.,

ACKEMANN M. F., LAMM K. R., HAYES H. T.

Selective immunosppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A.

Cancer Res., 1987, 47, pp 2259-2263.

MADSEN A., HALD B., MORTENSEN H. P.

Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs, detoxification by ammoniation heating + NaOH, or autoclavind

Acta Agric. Scand, 1983, 33, pp 171-175.

MALAVEILLE C., BRUN G., BARTSCH H.

Genotoxicity of ochratoxin A and structurally related compounds in E. coli strains, studies on their mode of actions.

In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract tumours.

Ed : Castegnaro M., Plastina R., Dirheimer G., Chernozunsky I. N., Bartsch H.

IARC Scientific Publ., IARC, Lyon, 1991, 115, pp 261-266.

MAYURA K., REDDY R. V., HAYES A. W., BERNDT W. O.

Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats.

Toxicology, 1982, 25, pp 175-185.

MEISNER H., CIMBALA M. A., HANSON R. W.

Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly (A) RNA level by ochratoxin A.

Arch. Biochem. Biophys., 1983, 223, pp 264-270.

MEISNER H., MEISNER P.

Ochratoxin A in vivo inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase
Arch. Biochem. Biophys., 1981, 208, pp 146-153.

MEISNER H., SELANIK P.

Inhibition of renal gluco neogenesis in rats by ochratoxin.
J. Biochem., 1979, 190, pp 681-684.

MISLIVEC P. B., TUITE J.

Temperature and relative humidity requirements of species of Penicillium isolated from yellow dent corn kernels
Mycologia, 1970, 62, pp 75-88.

MOLINIE A.

Qualité sanitaire des blés en région Midi – Pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines (ochratoxin A et citrinine). Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines.

Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 2004, pp 231.

MONKS T.J. & LAU S.S.

Commentary, renal transport process and glutathione conjugate mediated nephrotoxicity.

Drug metabol. Dispos. 1987, 15, pp 437- 441.

MORGAN M. R. A., Mc NERNEY R., CHAN H.W. S.

Enzyme linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley.
J. Assoc. Offc. Anal. Chem., 1983, 66, pp 1484-1484.

MORGAN M. R.A., Mc NERNEY R., CHAN H.W. S.

An ELISA for the analysis of the mycotoxin ochratoxin A in a food.

In: Immunoassay in Food Analysis.

Ed : B. A. Morris et M; N. Clifford.

London, Elsevier, 1985, pp 159-167.

MORI H., KAWAI K., BAYASHI F., KUNIYASU T., YAMAZAKI M.,

HAMAZAKI T., WILLIAMS G. M.

Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture / DNA repair test using rat and mouse hepatocytes.

Cancer Res., 1984, 44, pp 2918-2923.

MORTENSEN H. P., HALD B., MADSEN A.

Ochratoxin A contaminated barley for sows and piglets: pig performances and residues in milk and pigs.

Acta Agric. Scand., 1983, 33, pp 349-352.

MÜLLER G., KIELSTEIN P., KOHLER H., BERNDT A., ROSNER H.

Studies on the influence of ochratoxin A in immune and defense reactions in the mouse model.

Mycoses, 1995, 38, pp 85-91.

NESHEIM S.

Analysis of ochratoxin A and B and their esters in barley, using partition and thin layer chromatography. II. Collaborative study.

J. Assoc. Offc. Anal. Chem., 1973, 56, pp 822-826

NESHEIM S., STACK M. E., TRUCKSESS M. W., EPPELEY R. M.

Rapid solvent efficient method for liquid chromatographic determination of ochratoxin A in corn, barley, and kidney: Collaborative Study.

Journal of Assoc. Offc. Anal. Chem., 1992, 75, pp 418-487.

NORTHOLT M. D., VAN EGMOND H. P., PAULSCH W. E.

Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature.

J. Food P., 1979, 42, pp 485-490.

OMAR R. F., GELBOIN H. V., RAHIMTULA A. D.

Effect of cytochrome P 450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A.

Biochemical Pharmacology, 1996, 51, pp 207-216.

OMAR R. F., HASINOFF B. B., MEJILLA F., RAHIMTULA A. D.

Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation

Biochem. Pharmacol., 1990, 40, pp 1183-1191.

OMAR R. F., RAHIMTULA A. D., BARTSCH H.

Role of cytochrome P 450 in ochratoxin A stimulated lipid peroxidation.

J. Biochem. Toxicology, 1991 a, 6, pp 203-209.

OMINSKI R.H, MARQUADT R.R., SINHA R.N. & ABRAMSON D.

Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi.

In: Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin Ed: Miller J.D., Trenholm H.L.

Eagan Press, St Paul, Minesota, USA., 1994, pp 287 – 312 .

OSTER T., JAYYOSI Z., CREPPY E.E. , EL AMRI H.S. & BATT A.M.

Characterization of pig liver purified cytochrome P-450 isoenzymes
for ochratoxin A metabolism.

Studies. Toxicol. Lett., 1991, 57, pp 203-214.

PAULSCH W. E., VAN EGMOND H. P., SCHULLER P. L.

Thin layer chromatographyc method for analysis and chemical confirmation of
ochratoxin A in Kidneys of pigs.

In: Proceedings, V International IUPAC Symposium Mycotoxins and
Phytotoxins (1-3 septembre, 1982, Vienne, Autriche).

Vienne, Austrian Chem. Soc., 1982, pp 40-43.

PETKOVA BOCHARAROVA T., CHERNOZEMSKI I. N.,

CASTEGNARO M.

Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and
urinary systems tumours in Bulgaria.

Food Additives and contaminants, 1988, 5, pp 299-301.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.

Métabolisation des mycotoxines- Effets biologiques et pathologies-
Ecotoxicogenèse. Dans « Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et
gestion du risque » de Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France.

Technique et Documentation,Paris, 1999 pp. 18- 35.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.

Définition et origine des mycotoxines, *in* : Les mycotoxins dans
l'alimentation : évaluation et gestion du risqué, Ed. TEC et DOC,
Lavoisier, Paris, 1999. 3-15.

PFOHL-LESZKOWICZ.A., CASTEGNARO.M.

Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancers

Des toxines et recherches biomédicales

collection SFET, Gougey-Perrière.F, Bon Cassian, Puiseux-Dao.S

Sauviat M-P (eds) Elsevier, 2002, pp 143-152

PFOHL – LESZKOWICZ A., PETKOVA – BOCHAROVA T.,

CHERNOZEMSKY I. N., CASTEGNARO M.

Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins.

Food Additives & contaminants, 2002 b, 19, pp 282-302.

PFOHL – LESZKOWICZ A., GROSSE Y., PFEIFER A., OBRETCHT

S., DIRHEUMER G.

Métabolisation et génotoxicité de l'ochratoxine A.

In : Ochratoxicoses et Néphropathies : Situation Endémique (25, 26 Novembre 1994, Monastir).

Colloque International, 1994 b, 29,

PITOUT M. J.

The hydrolysis of ochratoxin A by proteolytic enzymes.

Biochemical Pharmacology, 1969, 18, pp 485-491.

PITT J. L.

Penicillium viridicattum, Penicillium verrucosum and production of ochratoxin A.

Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53, pp 266-269.

POHLAND A. E., NESHEIM S., FRIEDMAN L.

Ochratoxin A: review.

Pure and Appl. Chem., 1992, 64, pp 1029-1046.

POPPE S. M., JEFFERY L. , STUCKHARDT J. L., SZCZECH G. M.

Postnatal behavioural effects of ochratoxin A in offspring treated mice.

Teratology, 1983, 27, pp 293-300.

PURCHASE I. F. H., THERON J. J.

The acute toxicity of ochratoxin to rats.

Food Chem. Toxicol., 1968, 6, pp 479-483.

RAHIMTULA A. D., BEREZIAT J. C., BUSSACHINI – GRIOT V.,

BARTSCH H.

Lipid peroxydation as a possible cause of ochratoxin A toxicity

Biochemical Pharmacology., 1988, 37, pp 4469-4477.

RAHIMTULA A. D., CHONG X.

Alteration in calcium homeostasis as a possible cause of ochratoxin A nephrotoxicity.

In: Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract Tumours

Ed : M. Castegnaro, R Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky and H Bartsch.

Lyon, IARC scientific publication, 1991, 115, pp 207-214.

RICHARD.H

Épices et herbes aromatiques

Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1992, 339 p

**ROTH A., CHAKOR K., CREPPY E. E., KANE A.,
RÖSCHENTHALER R., DIRHEIMER G.**

Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats
Toxicology, 1988, 48, pp 293-308.

**ROUSSEAU D. M., CANDLISH A. A. G., SLEGERS G. A., VAN
PETEGHEM C. H., STIMSON W. H., SMITH J. E.**

Detection of ochratoxin A in porcine Kineys by a monoclonal antibody-based
radioimmunoassay.

Appl. And Environ Microbiol, 1987, 53, pp 514-518.

RUTQVIST L., BJORKLUND N. E., HULT K., CARLSSON B.

Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattering pigs.

Appl. And Environ Microbiol, 1978, 36, pp 920-925.

SAHA, D., ACHARYA, D., ROY, D., SHRESTHA, D., & DHAR, T. K.

Simultaneous enzyme immunoassay for the screening of aflatoxins B1 and
ochratoxin A in chili samples.

Analytica Chimica Acta, 2007, 584, 343–349.

SANDOR G., GLAVITS R., VAJDA L., VANYL A., KROGH P.

Epidemiologic study of ochratoxin A- associated porcine nephropathy in
Hungary. In: Proceedings, V International IUPAC Symposium Mycotoxins and
Phytotoxins (1-3 septembre, 1982 Vienne, Autriche)

Vienna, Austria Chem. Soc., 1982, pp 349-352.

**SANGARE B.T., MOUKHA.S., KOUADIO.J.H., BETBEDER.A.,
DJEDJE.S.D & CREPPY.E.E.**

Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and
Zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire

Department of Toxicology, University of Bordeaux 2, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux, France

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan,

University of Cocody, BPV34 Abidjan, Côte d'Ivoire

INRA-MycSA, P.B. 81, 33883 Villenave d'Ornon, France ,2006

**SANGARE B.T., DEM.A.A., MOUKHA.S., KOUADIO.J.H.,
BETBEDER.A., DJEDJE.S.D & CREPPY.E.E.**

Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice, and peanuts in Côte d'Ivoire from 1998 to 2002

Hum Exp toxicol. 2006, apr, 25(4): 211-6

**SANGARE B.T., MOUKHA.S., KOUADIO.J.H., DANO.D.S.,
ACHOUR.A., BETBEDER.A., & CREPPY.E.E.**

Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire

Toxicon 2006, 47: 894-900

SANSING G.A., DAVIS N.D., DIENER U. L.

Effect of time and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus*

Can. J. Microbiol. 1973, 19, pp 1259-1263.

SANSING G. A., LILLEHOJ E. B., DETRY R. W., MILLER M. A.

Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin A and penicillic acid in mice.

Toxicon., 1976, 14, pp 213-220.

**SCHWERDT G., FREUDINGER R., MILDENBERGER S.,
SILBERNAGL S.**

Apical to basolateral transepithelial transport of ochratoxin A by two subtypes of Madin-Darby canine kidney cells.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA), Biomembranes, 1997, 1324, pp 191-199.

SCOTT P. M., KANHERE S. R.

Determination of ochratoxin A in beer.

Food Addit. Contamin., 1995, 12, pp 591-598.

SHOTWELL O. L., HESSELTINE C. W., GOULDEN M. L.

Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample.

Appl. Microbiol., 1969, 17, pp 765-766.

STEYN P. S., HOLZAPFEL C. W.

The synthesis of ochratoxin A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh.

Tetrahedron, 1967, 23, pp 4449-4461.

STEYN P. S., HOLZAPFEL C. W., FERREIRA N. P.

Biosynthesis of the ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*.

Phytochem.., 1970, 9, pp 1977-1983.

STOJKOVIC R., HULT K., GAMULIN S., PLESTINA R.

High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents..

Biochem. Int., 1984, 9, pp 33-38.

STOREN O., HOLM H., STORMER F. C.

Metabolism of ochratoxin A by rats.

Applied and Environmental Microbiology, 1982b, 44, pp 785-789.

STOREN O., HELGERUD P., HOLM H., STORMER F. C.

Formation of (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin α by rats.

In: Proceedings, V international IUPAC Symposium Mycotoxins and Phytotoxins, (1-3 septembre, 1982, Vienne, Autriche).

Vienne, Austrian Chem. Soc., 1982 a, pp 321-324.

STORMER F. C., HANSEN C. E., PEDERSEN J. I.,

HVISTENDAHL G., AASEN A. J.

Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochration A by liver microsomes various species

Applied and Environmental Microbiology, 1981, 42, pp 1051-1056.

STORMER F. C., STOREN O., HANSEN C. E., PEDERSEN J. I.,

AASES A. J.

Formation of (4R)-and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin a by rabbit liver microsomes .

Applied and Environmental Microbiology, 1983, 45, pp 1183-1187.

STORMER F. C., LEA T.

Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation.

Toxicology, 1995, 95, pp 45-50.

STUDER - ROHR I., SCHLATTER J., DIETRICH D. R.

Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans.

Archives of Toxicology, 2000, 74, pp 499-510.

SUZUKI S., MOROI K., KANISAWA M., SATOH T.

The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats.

Japanese Journal of Pharmacology, 1977, 27, pp 735-744.

**THIRUMALA-DEVI, K., MAYO, M. A., REDY, G., EMMANUEL, K. E.,
LARONDELLE, Y., & REDDY, D. V. R.**

Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India.

Food Additives and Contaminants, 2001, 18, 830-835.

TERPLAN G., WENZEL S.

Untersuchungen zum Einfluss des Mycotoxins ochratoxin A auf die Tiergesundheit und auf das Rückstandsverhalten beim Schwein und aus daraus hergestellten Wurstwaren.

Archiv für lebensmittelhygiene, 1993, 44, pp 129-152.

TRENK H. L., BUTZ M. E., CHU F. S.

Production of ochratoxin A in different cereal products by *Apergilus ochraceus*.

Appl. Microbiol., 1991, 21, pp 1032-1035.

TRIVEDI A. L., DOI E., KITABATAKE N.

Detoxication of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions.

Biosci. Biochem., 1992, 56, pp 741-745.

UENO Y.

Biotransformation of mycotoxins in the reconstituted cytochrome P450 system.

Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol., 1985, 22, pp 28-30.

VAN BLANDEREN P.J., BREIMER D.D., ROHERVELL-SMITH

G.M.T., JONG R.A., BUIJS W., VAN DER GEN A., MOHR G.R.

The role of glutathione conjugation in the mutagenicity of 1,2-dibromo-éthane.

Biochem. Pharmacol., 1980, 29, pp 2975-2982.

VAN DER MERWE K. J., STEYN P. S., FOURIE L.

Mycotoxins. Parts II. The constitution of ochratoxins A, B and C metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh

Journal of the Chemical Society, 1965a, 1, pp7083-7088.

VAN DER MERWE K. J., STEYN P. S., FOURIE L., SCOTT D. B.,

THERON J. J.

Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh.

Nature, 1965 b, 2205, pp 1112-1113.

VAN EGMOND H.P.

Methods for determining ochratoxin A and other nephrotoxic

Mycotoxins. In: Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours.

Ed : Castegnaro M., Plestina R, Dirheimer G., Chernozemsky I.N., Bartsch H.

IARC, Sci. Publications, IARC, Lyon, 1991, 115, pp 57-70.

VAN GINKEL G., SEVANIAN A.

Lipid peroxydation- induced membrane structural alterations.

Methods in enzymology, 1994, 233, pp 273-288.

VERMA R. J., SHALINI M.

Hyperglycemia induced in rabbits exposed to ochratoxin.

Bul. Envriion. Contam. Toxicol., 1998, 60, pp 626-631.

WAGNER B. A., BUETTNER G. R., BURNS C. P.

Free radical – mediated lipid peroxydation in cells: oxydizability is a function of cell lipid bis – allylic hydrogen content.

Biochemistry, 1994, 33, pp 4449-4453.

WEI Y. H., LU C. Y., LIN T. N., WEI R. D.

Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation.

Toxicology, 1985, 86, pp 119-130.

WEI X., SULIK K. K.

Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice.

American Journal of Medical Genetics, 1993, 47, pp 862-871.

WHO

Evaluation of certain mycotoxins in food, technical report series 906, fifty-six report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, who, Geneva, International program on chemical safety. 2002

XIAO H., MADHYASTHA S., MARQUARDT R. R., LI S., VODELA J. K., FRÖHLICH A. A., KEMPPAINEN B. W.

Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure – activity relationships.

Toxicology and Applied Pharmacology, 1996, 137, pp 182-192.

YAMAZAKI M., MAEBAYASHI Y., MIYAKI K.

The biogenesis of ochratoxin A.

Tetrahedron Lett., 1971, 25, pp 2031

YONG S., ALBASSAM M., PRIOR M.

Protective effects of sodium bicarbonate on murine ochratoxicosis.

J. Environ. Sci. Health, 1987, B22 pp 455-470.

ZIMMERLI.B., DICK.R.

Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood,
serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid
chromatography with enhanced fluorescence detection and
immunoaffinity column cleanup : methodology and swiss

J chromatogr B, 1995, 666, 85-99

ZIMMERLI B., DICK R.

Ochratoxin A in table wine and grappe juice: occurrence and risk assessment.

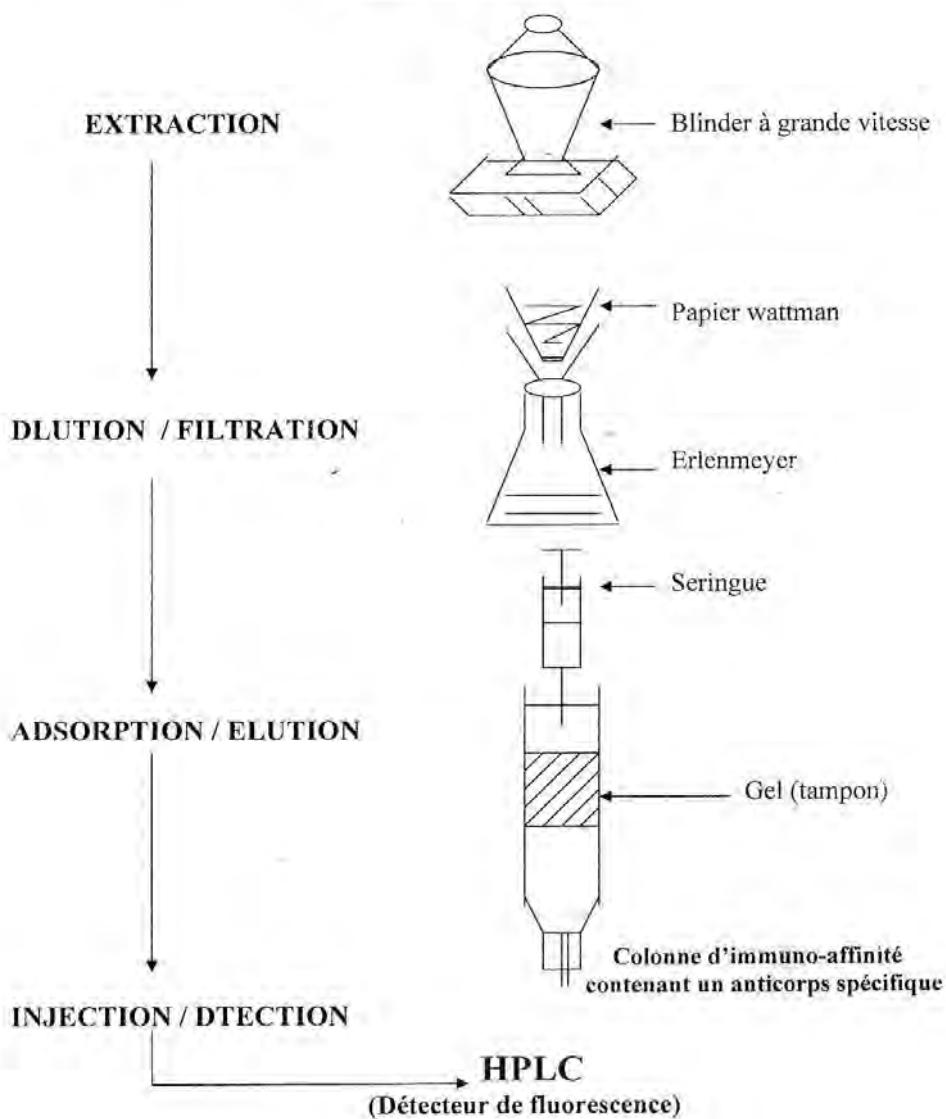
Food Addit. Contam., 1996, 13, pp 655-668.

WEBOGRAPHIE

- www.lesjardinslaurentiens.com (consulte le 10 fevrier 2013)
- www.egk.ch/fr/doc/nl/poivre.pdf (consulte le 28 mars 2013)
- [www.padma.ch/fr/plantes/descriptifs-botaniques/s-z/zingiber-officinale.](http://www.padma.ch/fr/plantes/descriptifs-botaniques/s-z/zingiber-officinale)
(consulte le 28 mars 2013)
- www.pluriel.fr/santéforme/poivre-noir-propriété (consulte le 10 fevrier 2013)
- www.toildepices.com (consulte le 10 fevrier 2013)
- www.moncoachingminceur.com/dossier/les-epices-parfums-et-saveurs-en-cuisine/origine-et-histoire-des-epices(consulte le 10 fevrier 2013)
- [www.zum.de/stueber/koehler_2 /index.htm](http://www.zum.de/stueber/koehler_2/index.htm) Medizinal-pflanzen,Köhler (1887) (consulte le 10 mai 2013)
- Caliban.mpg.de/stueber/Koehler/index.html Medizinal-pflanzen, Köhler (1883) (consulte le 10 mai 2013)
- <http://maps.google.abidjan/> (consulté le 10 mai 2013)

ANNEXES

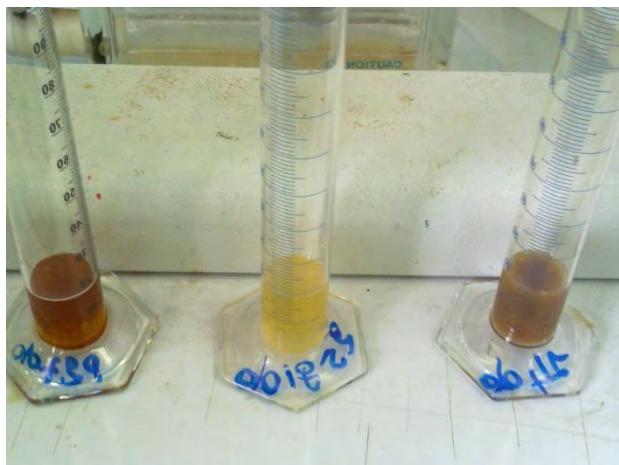
Figure 8 : Schéma montrant les principales étapes utilisées pour l'analyse des mycotoxines par HPLC.



(Thèse ATOUIL.K.A. 2006)



LE BROYAGE DU GINGEMBRE



FILTRATION DES ECHANTILLONS

(Adannou.M, 2013)



ADSORPTION / ELUTION (Adannou.M, 2013)





APPAREIL HPLC (Adannou.M, 2013)

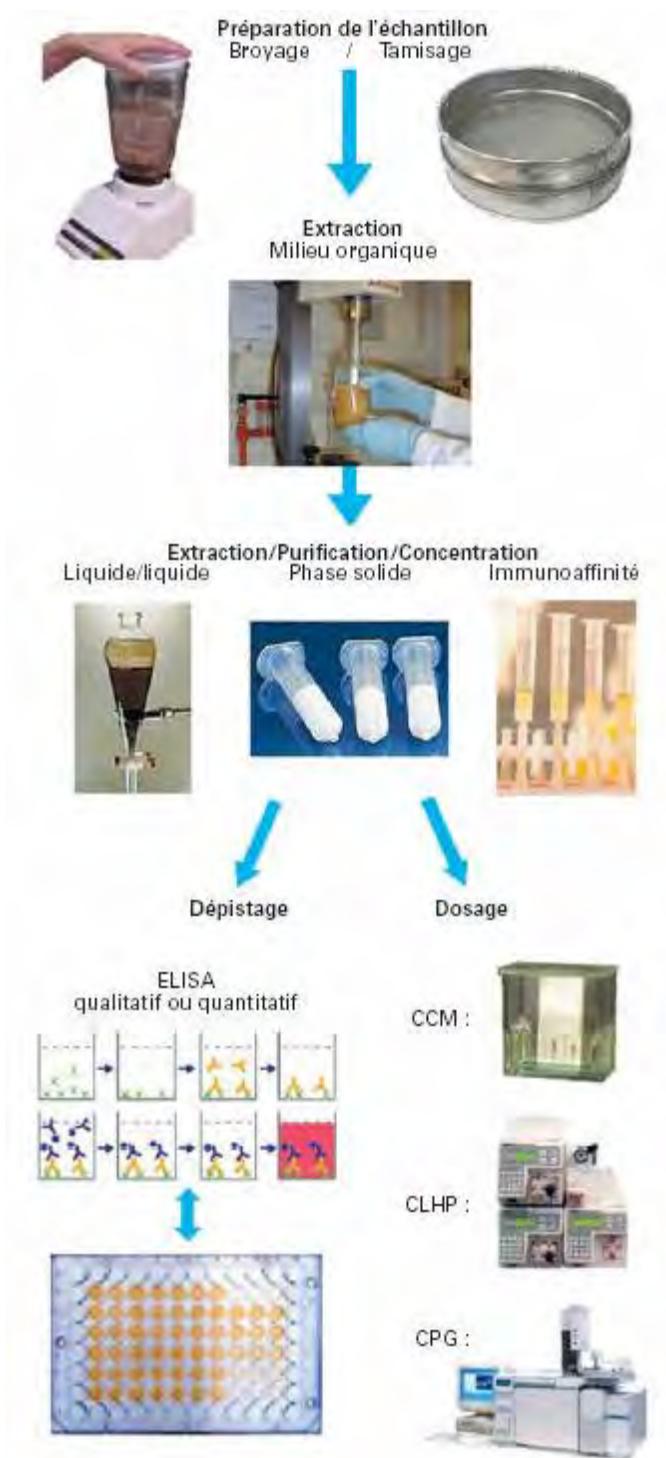
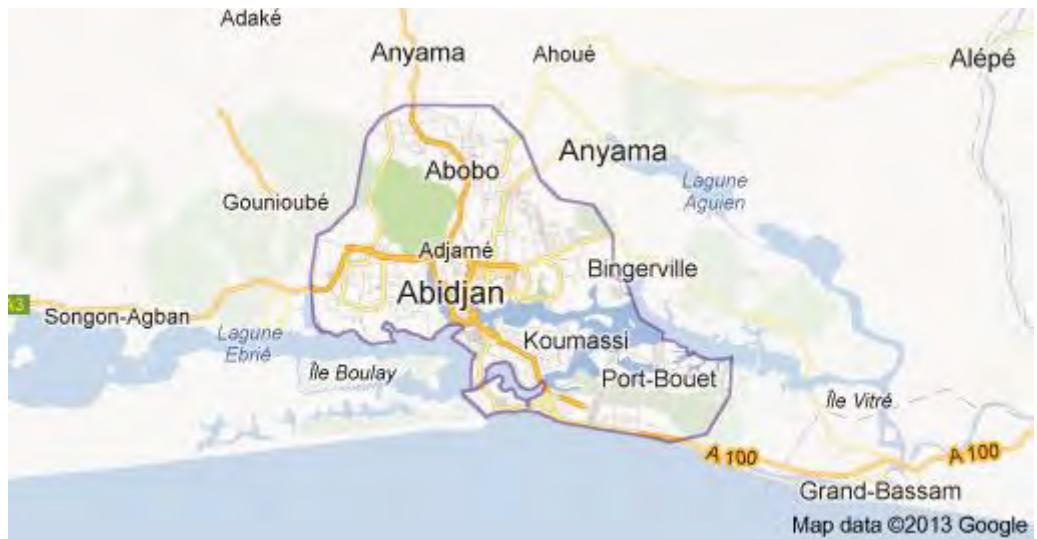


Figure Les différentes étapes de la quantification des mycotoxines dans les aliments
 (Thèse Abdellah.Z, 2004)



Carte d'Abidjan (maps.google.abidjan)

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :

Le Président du jury

Vu :

Le Doyen de.....

Vu et Permis d'imprimer

Pour le Recteur, Président de l'Assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar
et par délégation

Le Doyen