

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION – DISCIPLINE – TRAVAIL

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année : 2014 – 2015

N°1704/15

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

GOUET Zroh Julien

**INCIDENCE DE LA QUALITE SANITAIRE DE LA
CABOSSE DE CACAO SUR LA CONTAMINATION
EN OCHRATOXINE A**

Composition du jury

Président de jury : Monsieur MALAN KLA ANGLADE, Professeur titulaire
Directeur : Monsieur LOUKOU YAO GUILLAUME, Maître de conférence agrégé
Asseseurs : Monsieur EDOH VINCENT, Maître de conférence agrégé
Madame KOUAKOU SIRANSY GISELE, Maître de conférence agrégé

Table de matières

Table des matières	01
Liste des tableaux	05
Liste des figures	07
Liste des abreviations	09
Introduction	12
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	15
I - Origine et decouverte de l'OTA	16
II -Structure et proprietes physico-chimiques	17
II - 1 - Structure.....	17
II - 2 - Propriétés physico-chimiques.....	18
III - Production et biosynthese de l'OTA	22
III - 1 - Production naturelle de l'OTA.....	22
III - 2 - Production de l'OTA en laboratoire.....	25
III - 2 - 1 - <i>Culture en milieu liquide</i>	25
III - 2 - 2 - <i>Culture en milieu solide</i>	26
III - 3 - Biosynthèse de l'OTA.....	26
IV - Toxicocinetique	27
IV - 1 - Absorption.....	27
IV - 2 - Distribution.....	27
IV- 2 - 1 - <i>Distribution et liaison aux protéines</i>	27
IV- 2 - 2 - <i>Distribution tissulaire</i>	29
IV - 3 - Métabolisme.....	29
IV- 3 - 1 - <i>Métabolisme du groupement phenylalanine</i>	29
IV - 3 - 2 - <i>Métabolisme du groupement isocoumarinique</i>	30
IV - 3 - 3 - <i>Métabolisme par conjugaison au glutathion</i>	33
IV - 3 - 4 - <i>Autres voies de métabolisme</i>	33
IV - 4 - Excrétion de l'OTA et de ses métabolites.....	34
V -Mecanisme d'action de l'OTA	37

V - 1 - Mode d'action au niveau de la transcription et de la traduction.....	37
V - 2 - Mode d'action sur le métabolisme glucidique	39
V - 3 - Perturbations oxydatives (peroxydation lipidique)	39
V - 4 - Mode d'action sur la respiration mitochondriale.....	42
V - 5 - Mode d'action sur le métabolisme calcique.....	42
V - 6 - Interactions avec d'autres mycotoxines.....	42
VI - Etude toxicologique chez l'animal.....	43
VI - 1 - Toxicité aiguë.....	43
VI - 2 - Toxicité subaiguë ou subchronique.....	44
VI - 3 - Toxicité chronique chez les animaux :.....	46
VII - Principaux effets biologiques.....	46
VII - 1- OTA et santé animale.....	46
VII - 1 - 1 - <i>Néphrotoxicité et perturbation de la fonction rénale</i>	46
VII - 1 - 2 - <i>Effets sur la coagulation</i>	48
VII - 1- 3 - <i>Immunotoxicité</i>	48
VII - 1 - 4 - <i>Neurotoxicité</i>	50
VII - 1 - 5 - <i>Tératogénicité</i>	51
VII - 1 - 6 - <i>Génotoxicité et mutagénicité</i>	53
VII - 2 - OTA et santé humaine.....	54
VII - 2 - 1 - <i>Néphropathie aigüe</i>	57
VII - 2 - 2 - <i>Néphropathie endémique des Balkans</i>	57
VII - 2 - 3 - <i>Néphropathie interstitielle chronique de l'Afrique du Nord</i>	58
VIII -Détection et dosage de l'OTA.....	59
VIII - 1 - Dosage de l'OTA par chromatographie sur couche mince (CCM).....	59
VIII - 2 - Dosage de l'OTA par chromatographie liquide haute performance.	59
VIII - 3 - Méthode enzymatique de confirmation.....	60
VIII - 4 - Méthode de couplage avec la spectrométrie de masse.....	60
VIII - 5 - Méthodes immunologiques.....	60
IX -Moyen de prevention de l'OTA.....	61

IX - 1 - Détoxification de l'OTA.....	61
IX - 1 - 1 - <i>Traitements physiques</i>	61
IX - 1 - 2 - <i>Traitements chimiques</i>	62
IX - 1 - 3 - <i>Combinaison de traitements chimiques et physiques</i>	63
IX - 1 - 4 - <i>Traitements enzymatiques</i>	63
IX - 2 – Utilisation des molécules protectrices.....	64
IX - 2 - 1 - <i>Effets protecteurs de la phénylalanine</i>	65
IX - 2 - 2 - <i>Effets de la vitamine A sur la génotoxicité induite par l'OTA</i>	67
IX - 2 - 3 - <i>Effets de la vitamine C sur la génotoxicité de l'OTA</i>	67
IX - 2 - 4 - <i>Effets protecteurs du bicarbonate de sodium (NaHCO₃)</i>	68
IX - 2 - 5 - <i>Effets protecteurs de la cholestyramine</i>	68
X – Presence naturelle de l'OTA dans les produits vegetaux et animaux	69
XI - Ochratoxine a et legislation	72
XII - Generalites sur le cacao	74
XII - 1 - Origine et découverte du cacao.....	74
XII - 2 - Historique du cacao en Côte d'ivoire.....	74
XII - 3 - Description botanique et caractéristiques techniques du cacaoyer.....	75
XII - 4 - Culture du cacao.....	76
XII - 5 - Traitements post-récolte.....	76
XII - 5 - 1 - <i>Récolte</i>	76
XII - 5 - 2 - <i>Ecabossage</i>	77
XII - 5 - 3 - <i>Fermentation</i>	77
XII - 5 - 4 - <i>Séchage</i>	77
XII - 6 - Problème de contamination du cacao par l'Ochratoxine A.....	78
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	80
I - Collecte des echantillons	81
I - 1 – Matériel.....	81
I- 2 - Méthodologie.....	81
II-Dosage de l'OTA	89

II – 1-Matériels.....	89
II - 2 - <i>Méthode de dosage</i>	93
II-2-1.Extraction de l’OTA.....	93
II-2-2.Purification sur colonne d’immuno affinité.....	94
II-2-3.Dosage par le système HPLC.....	94
II-2-4.Validation de la méthode analytique.....	97
III - Resultats	99
III-1.Etude de la validation analytique.....	99
III-1-1.Linéarité de la méthode.....	99
III-1-2.Répétabilité de la méthode.....	101
III-1-3.Justesse de la méthode.....	103
III-1-4.Exactitude de la méthode.....	104
III-1-5.Limite de détection de la méthode.....	104
III-1-6. Limite de quantification de la méthode.....	104
III - 2 - Résultats de la collecte des échantillons.....	105
III-3- Résultats de l’analyse quantitative des échantillons par HPLC.....	106
III- 3-1- Opération post-récolte : ecabossage.....	106
III- 3-2- Opération post-récolte : fin fermentation.....	107
III- 3-3- Opération post-récolte : fin du séchage.....	108
III-4-Taux de contamination moyen en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans les différents échantillons par état sanitaire et par stade de transformation.....	109
III- 4-1- <i>Etape de l’ecabossage</i>	109
III -4-2- <i>Etape de la fin fermentation</i>	110
III-4-3- <i>Etape de la fin du séchage</i>	111
III-4-4. Synthèse des différents taux moyen d’OTA en $\mu\text{g}/\text{kg}$ par état sanitaire de la cabosse de cacao en fonction des opérations post-récolte.....	112
IV - Discussions	113
Conclusion generale	117
Recommandations	119

Références bibliographiques..... 121

Liste des tableaux

Tableau I : Principales moisissures productrices d'OTA.....23

Tableau II : Demi-vie plasmatique de l'OTA après administration orale
d'une dose unique.....28

Tableau III : DL₅₀ de l'OTA chez différentes espèces animales.....43

Tableau IV : Résultats d'étude toxicologique subaiguë chez certaines espèces.....45

Tableau V : Teneur en OTA dans le sang et dans le lait chez l'homme.....55

Tableau VI : Teneur en OTA dans le sang humain à Abidjan.....56

Tableau VII : Fréquence et taux de contamination en OTA de divers
aliments dans l'Union Européenne.....70

Tableau VIII : Résultat de l'analyse préliminaire de l'OTA dans
les aliments en Côte d'Ivoire.....71

Tableau IX : Principaux pays producteurs de fèves de cacao.....79

Tableau X : gamme étalon.....93

Tableau XI : étude de la répétabilité des solutions de référence.....101

Tableau XII : étude de la répétabilité des extraits de cacao.....102

Tableau XIII : étude de la répétabilité de la méthode sur un extrait de cacao.....103

Tableau XIV : résultats de l'étude de la justesse.....103

Tableau XV : étude de l'exactitude de la méthode.....104

Tableau XVI : Nombre d'échantillons par type de cabosse et par stade de
transformation post récolte.....105

Tableaux XVII : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons
à l'écabossage à Abengourou.....106

Tableaux XVIII : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons
à l'écabossage à Gagnoa.....106

Tableaux XIX : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons
à l'écabossage à San Pedro.....106

Tableau XX : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons

à la fin fermentation à Abengourou.....	107
Tableau XXI : Taux d’OTA en µg/kg dans les différents échantillons à la fin fermentation à Gagnoa.....	107
Tableau XXII : Taux d’OTA en µg/kg dans les différents échantillons à la fin fermentation à San Pedro.....	107
Tableaux XXIII : Taux d’OTA en µg/kg dans les différents échantillons à fin du séchage à Abengourou.....	108
Tableaux XXIV : Taux d’OTA en µg/kg dans les différents échantillons à fin du séchage à Gagnoa.....	108
Tableaux XXV : Taux d’OTA en µg/kg dans les différents échantillons à fin du séchage à San Pedro.....	108
Tableau XXVI : Taux moyen d’OTA par type de cabosse à l’écabossage.....	109
Tableau XXVII : Taux moyen d’OTA par type de cabosse à la fin fermentation....	110
Tableau XXVIII : Taux moyen d’OTA par type de cabosse à la fin séchage.....	111
Tableau XXIX : Tableau récapitulatif des taux moyen d’OTA en µg/kg par état sanitaire de la cabosse de cacao en fonction des opérations post récolte (écabossage, fermentation et séchage).....	112

Liste des figures

Figure 1 :	Structure de l'OTA et des ses molécules la constituant.....	17
Figure 2 :	Structure de quelques dérivés de l'Ochratoxine.....	20
Figure 3 :	Analogues naturels de l'OTA.....	21
Figure 4 :	Dérivés hydroxylés de l'ochratoxine A produits par les Cytochromes P450 et la phénylalanine hydroxylase	32
Figure 5 :	Excrétion tubulaire de l'OTA.....	36
Figure 6 :	Effets de l'OTA sur la synthèse des protéines.....	38
Figure 7 :	Formation de dérivés radicalaires de l'oxygène et effets toxiques au niveau cellulaire.....	41
Figure 8 :	Principales zones de production de cacao (hachurées en noir).les zones de collecte des échantillons : Abengourou, Gagnoa et San Pedro.....	82
Figure 9 :	a) Cabosse de cacao intacte ;b) Cabosse de cacao intacte à l'ouverture	84
Figure 10 :	c) Cabosses de cacao piquées ; d) Cabosse de cacao piquée à l'ouverture...	84
Figure 11 :	e) Cabosses de cacao pourries ;f) Cabosse de cacao pourrie à l'ouverture...	85
Figure 12 :	g) Cabosses de cacao blessées ;h) Cabosses de cacao blessées à l'ouverture	85
Figure 13 :	Ecabossage des cabosses de cacao.....	86
Figure 14 :	i) Fèves de cacao en fermentation sous feuilles de bananier ; j) fèves de cacao fermentées.....	87
Figure 15 :	Fèves de cacao en séchage sur bâche noire.....	88
Figure 16 :	Système HPLC.....	90
Figure 17 :	courbe d'étalonnage avec une gamme de concentration de 0 à 40 ng/ml...	99
Figure 18 :	chromatogramme d'une solution de référence (5 µg/l).....	100
Figure 19a :	chromatogramme de l'échantillon de référence FAPAS café.....	100
Figure 19 b :	chromatogramme d'un extrait de cacao.....	101

Figure 20 : Niveau moyen de contamination en OTA par type de cabosses à l'écabossage.....109

Figure 21 : Niveau moyen de contamination en OTA par type de cabosses à la fin de la fermentation.....110

Figure 22 : Niveau moyen de contamination en OTA à la fin du séchage.....111

Figure 23 : Niveau de contamination par état sanitaire de la cabosse de cacao aux différents stades de transformation post récolte.....112

Liste des abréviations

Aw : Teneur en eau

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARCC : Autorité de régulation du café et de cacao

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATA : Aleucie toxique alimentaire

ATP : Adénosine triphosphate

CHU : Centre hospitalier et universitaire

CCM : Chromatographie sur couche mince

CNRA : Centre national de recherche agronomique

CYP : Cytochrome P450

DA : Dalton

DJT : Dose journalière tolérable

DTH : Dose tolérable hebdomadaire

DL50 : Dose létale 50

ELISA : Enzyme-linked immunoadsorbent assay

g/mol : Gramme par mole

g/l : Gramme par litre

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IgM : Immunoglobuline M

IgG : Immunoglobuline G

IL2 : Interleukine 2

JECFA : Comité conjoint OMS /FAO d'expert sur les additifs alimentaires

kGy : Kilogramme gray

LDH : Lactate déshydrogénase

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

mg/Kg : Milligramme par kilogramme

mg/g : Milligramme par gramme

M : Mole

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase

NEB : Néphropathie endémique des Balkans

nm : Nanomètre

ng/kg : Nanogramme par kilogramme

ng/ml : Nanogramme par millilitre

ng/g : Nanogramme par gramme

OTA : Ochratoxine A

OTB : Ochratoxine B

OTC : Ochratoxine C

OTD : Ochratoxine D

OT α : Ochratoxine α

OMC : Organisation mondiale du commerce

OMS : Organisation mondiale de la santé

PM : Poids moléculaire

PGHS : Prostaglandine H synthétase

PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PAL : Phosphatase alcaline

PAC : Phosphatase acide

PC : Poids corporel

pH : Potentiel d'hydrogène

RIA : Radio-immuno-assay

SOD : Superoxyde dismutase

UE : Union européenne

UV : Ultra violet

UI : Unité internationale

μ : Micron

μg/kg : Microgramme par kilogramme

γGT : Gamma glutamyl transpeptidase

INTRODUCTION

L'Ochratoxine A (OTA), est une mycotoxine élaborée par certaines espèces de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*. C'est un contaminant alimentaire identifié dans les céréales, les oléagineux, le café, les fruits secs, la bière, les vins, le cacao etc. Elle présente un danger réel aussi bien pour l'homme que pour l'animal à cause de ses nombreux effets toxiques notamment au niveau rénal.

Le 19 Décembre 2006, le règlement CE n° 1881/2006 de la Commission Européenne fixe les limites maximales de l'OTA dans certaines denrées alimentaires notamment les céréales brutes 5, les raisins secs 10, les grains de café torréfié et café moulu 5, le café soluble 10, le vin 2, les aliments pour nourrissons et enfants en bas âge 0,5µg/kg. Cette commission juge opportun de mener des investigations afin de fixer ou non une teneur maximale en OTA dans le cacao et ses produits dérivés, ainsi que dans le café vert et d'autres denrées alimentaires.

La Côte d'Ivoire, premier pays exportateur mondial de cacao avec 1,223 millions de tonnes en 2009, est directement concernée par cette fixation de taux d'OTA qui pourrait lui faire perdre des parts sur le marché européen avec des conséquences néfastes pour son économie notamment une baisse des revenus aux planteurs et au pays.

Ainsi, pour résoudre la problématique, le pays a entrepris avec l'appui de ses partenaires des études regroupées sous différents thèmes :

- ✓ thème 1 : Détermination du niveau de contamination par l'OTA de la production nationale du café et du cacao,
- ✓ thème 2 : Identification des points critiques de contamination du cacao par l'OTA
- ✓ thème 3 : Traitement industriel du café et du cacao et la réduction de la teneur en OTA.
- ✓ thème 4 : Identification d'une méthode d'échantillonnage du cacao pour le dosage de l'OTA.

Les thèmes 1 et 2 devraient permettre la mise en place d'un programme de prévention devant garantir un faible taux de contamination en OTA du café et du cacao par la vulgarisation de bonnes pratiques agricoles aux producteurs.

Pour cela, la connaissance et l'identification de tous les facteurs susceptibles d'entraîner une contamination des fèves de cacao par l'OTA dans le traitement post-récolte, est également nécessaire. Ce thème intitulé « Identification des points critiques de contamination du cacao par l'ochratoxine A » comprend trois sous thèmes de recherche :

- 1) Etude de l'influence des supports de fermentation, de séchage et de stockage sur la contamination en OTA des fèves de cacao.
- 2) Identification des espèces de moisissures productrices d'OTA.
- 3) Et l'étude de l'incidence de la qualité sanitaire de la cabosse de cacao sur la contamination en OTA des fèves de cacao.

Notre travail s'inscrit dans ce troisième sous thème. Il a pour objectif principal d'établir une relation entre l'état sanitaire de la cabosse de cacao qui représente les différents aspects du cortex extérieur de la cabosse mûre sans ou avec des lésions (lésions dues aux insectes, à la machette, les microbes, etc) et le niveau de contamination en OTA des fèves sèches destinées à l'exportation.

Il ressort de cet objectif principal, les objectifs spécifiques suivants :

- Classer les cabosses de cacao en fonction de leur état sanitaire.
- Déterminer pour chaque type de cabosses le niveau de contamination en OTA des fèves sèches.
- Comparer les niveaux de contamination en OTA en fonction de l'état sanitaire et en déduire les types de cabosses responsables de la contamination en OTA.
- Enumérer les mesures appropriées pour éviter la contamination en OTA.

Notre étude comporte deux parties :

- ✓ La première partie est constituée d'une revue bibliographique sur l'ochratoxine A
- ✓ La deuxième partie présente l'approche expérimentale suivie des résultats obtenus, les commentaires qu'ils ont suscités, d'une conclusion générale et des recommandations qui en découlent.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES

I - ORIGINE ET DECOUVERTE DE L'OCHRATOXINE A

Si certains champignons microscopiques ont un apport bénéfique grâce aux procédés de fermentation, d'autres, par contre, sont connus pour leur rôle néfaste de contaminants des produits d'origine végétale ou animale. Ces moisissures peuvent affecter la qualité des aliments qu'ils contaminent, devenant ainsi un danger pour la santé humaine ou même animale. Ce sont des microorganismes qui ont été responsables d'énormes pertes en vies humaines.

Au moyen âge, et ce jusqu'au 19^{ème} siècle, des épidémies mortelles étaient provoquées par des intoxications fongiques dues à l'ingestion d'un champignon parasite du Seigle appelé "ergot de seigle" (*Claviceps purpurea*); décrites sous le nom de "Mal des ardents" ou "Feu de Saint Antoine", elles étaient attribuées, à cette époque, à des effets de sorcellerie.

En 1960, l'intoxication d'un élevage de dindonneaux a conduit des chercheurs anglais à analyser les tourteaux d'arachides leur servant de nourriture. Ils ont ainsi mis en évidence la présence de l'*Aspergillus flavus* qui produit une substance appelée aflatoxine (Goldblatt, 1969).

En 1965, un groupe de chercheurs Sud-Africains isola pour la première fois l'Ochratoxine A à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus*, à l'occasion d'une recherche systématique sur les mycotoxines engagées à la suite d'intoxications provoquées par les aflatoxines, ainsi qu'à la faveur de recherche ayant pour objectif la découverte d'antibiotique (Van Der Merwe, 1965 ; Steyn, 1967). Des recherches ultérieures ont révélé que diverses autres moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* peuvent aussi sécréter des ochratoxines (Yamazaki, 1971).

II – STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO - CHIMIQUES

II-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)

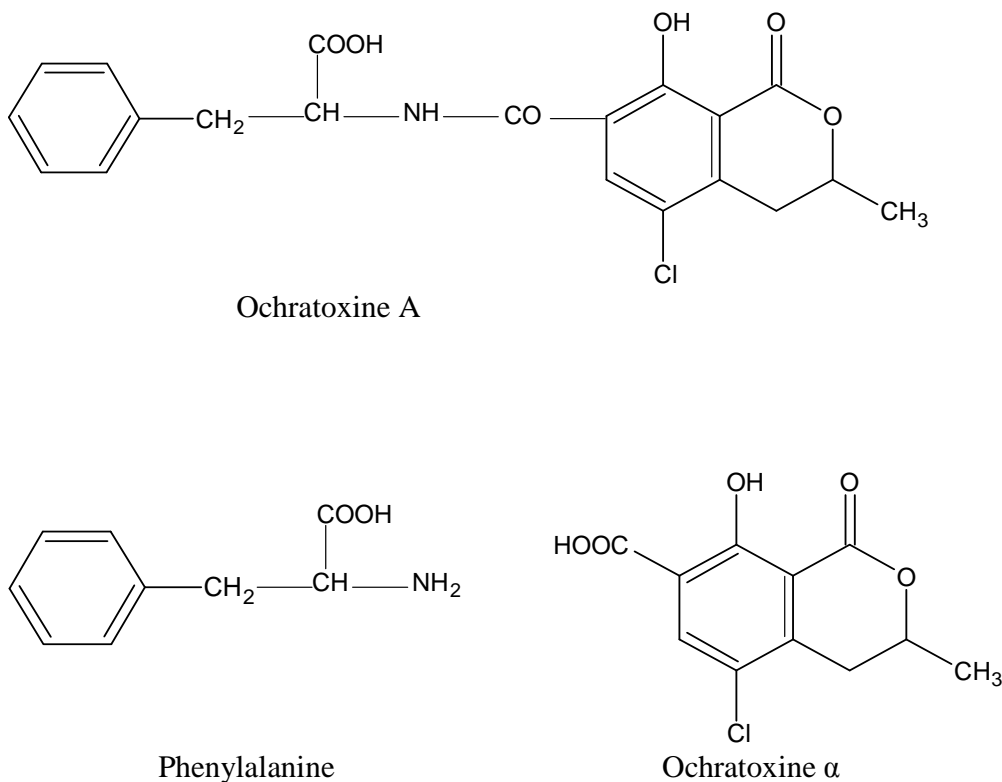


Figure 1 : Structure de l'OTA et des molécules la constituant (Van Der Merwe, 1965)

II - 2 - Propriétés physico-chimiques

La formule brute de l'Ochratoxine A est $C_{20}H_{18}ClNO_6$.

C'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.

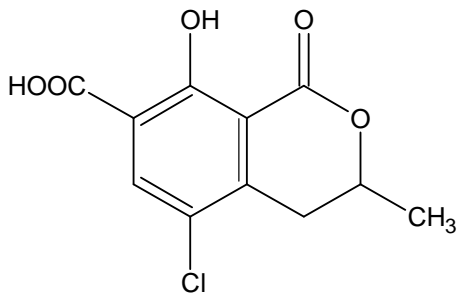
Les fonctions phénoliques et carboxyliques de l'OTA lui confèrent les propriétés physico-chimiques des acides faibles, caractérisées par des pKA de 6,75 et de 10,25 (Galtier, 1977). Elle peut être sous forme ionisée et non ionisée selon le pH du milieu. A pH acide, l'OTA est très soluble dans les solvants organiques polaires (alcools, cétones, benzène, chloroforme), peu soluble dans l'eau et insoluble dans les éthers de pétrole et les hydrocarbures saturés ; à pH alcalin, elle est très soluble et très stable dans le bicarbonate aqueux (0,1 M). L'OTA absorbe la lumière ultra-violette et son spectre d'absorption varie en fonction du pH et de la polarité du solvant. Dans le 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, 1997). Des solutions d'OTA sont complètement dégradées par un excès d'hypochlorite de sodium.. Un certain nombre de dérivés de l'OTA sont connus. il s'agit des dérivés non chlorés (Ochratoxine B) et des esters méthyliques ou éthyliques (Ochratoxine C) isolés par (Van der merwe, 1965 ; Steyn, 1970). Ces derniers auteurs ont également préparé des analogues structuraux de l'OTA en substituant la phenylalanine par d'autres acides aminés (Figure 2).

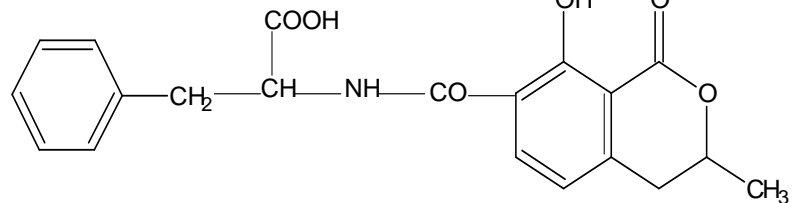
Par ailleurs, un autre dérivé, l'Ochratoxine D (OTD) ou la 4-hydroxy-OTA (4(R)-OH-OTA) a été isolée à partir de culture de *Penicillium verrucosum*.

Il faut aussi noter l'existence d'analogues structuraux de l'OTA obtenus par substitution de la phénylalanine par d'autres acides aminés (Steyn, 1970).

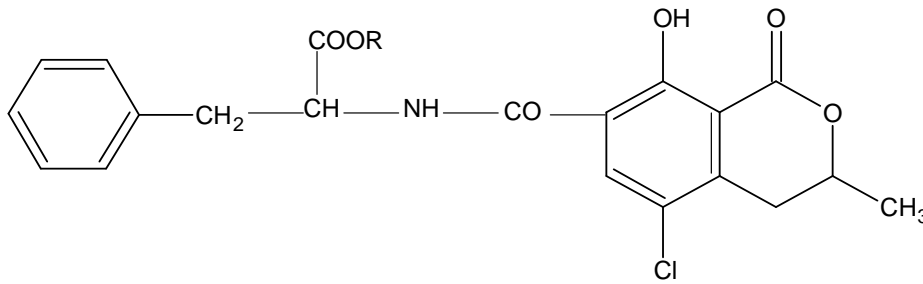
En 1992, Hadiane et coll ont, à partir de cultures d'*Aspergillus ochraceus*, isolé trois nouvelles molécules d'Ochratoxine dans lesquelles la phénylalanine est remplacée respectivement par la lysine, la sérine ou l'hydroxyproline. (Figure 3)



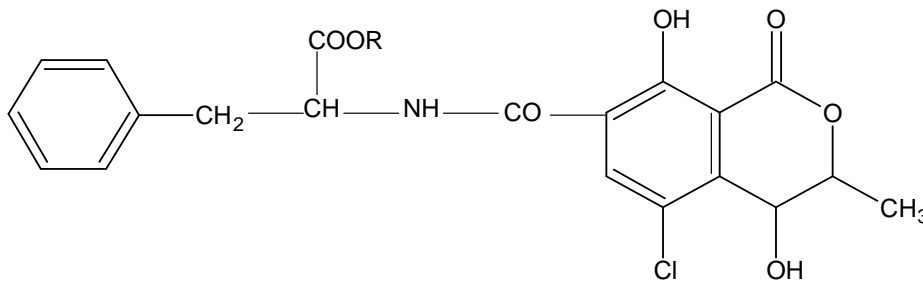
Ochratoxine α
(dérivé non chloré de l'OTA)



Ochratoxine B

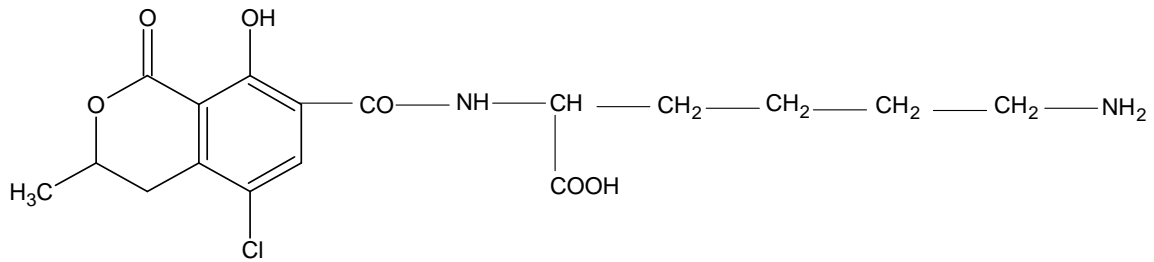


Ochratoxine C
(ester méthylique ou éthylique de l'OTA)
R=CH₃ ou C₂H₅

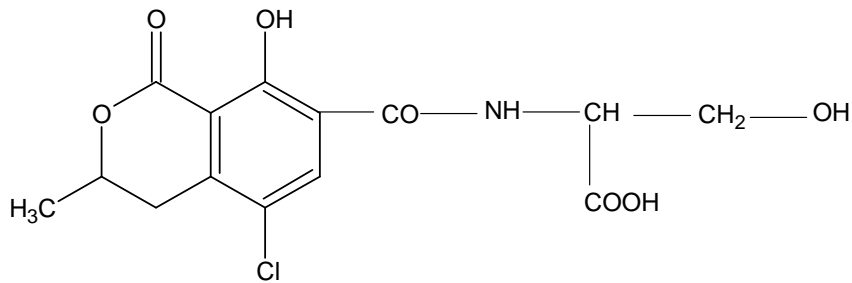


Ochratoxine D
(dérivé hydroxylé de l'OTA)

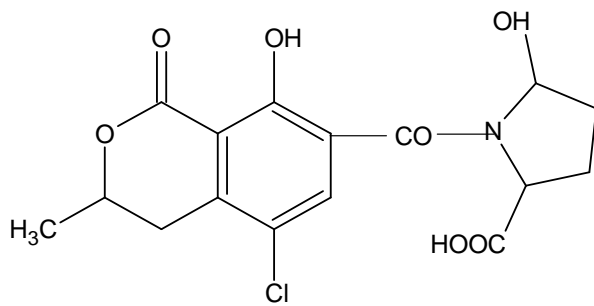
Figure 2 : Structure de quelques dérivés de l'Ochratoxine A



Lys-Ochratoxine



Ser- Ochratoxine



OH- Pro-Ochratoxine

Figure 3 : Analogues naturels de l'Ochratoxine A (Hadiane, 1992)

III - PRODUCTION ET BIOSYNTHESE DE L'OTA

III - 1 - Production naturelle de l'Ochratoxine A

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

.Tableau I : Principales moisissures productrices d'OTA

Espèces	Références
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Van der Merve et Coll. (1965) Nesheim (1967) Lai et coll. (1968) Natori et Coll. (1970) Ciegler (1972) Hesseltine et coll. (1972) Frisvad (1986) Skrinjar et Dimic (1992)
<i>Aspergillus melleus</i>	Ciegler (1972) Hesseltine et Coll. (1972)
<i>Aspergillus alliaceus</i>	Ciegler (1972) Hesseltine et Coll. (1972)
<i>Aspergillus ostianus</i>	Ciegler (1972) Hesseltine et coll. (1972)
<i>Aspergillus petrakii</i>	Ciegler (1972)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	Ciegler (1972) Hesseltine et Coll. (1972) Skrinjar et Dimic (1992)
<i>Aspergillus sulphureus</i>	Ciegler (1972) Hesseltine et Coll. (1972) Skrinjar et Dimic (1992)
<i>Aspergillus elegans</i>	Tsubouchi et Coll. (1985)
<i>Aspergillus fresenii</i>	Frisvad (1987)
<i>Aspergillus glaucus</i>	Chelkowski et Coll. (1987)
<i>Aspergillus niger</i>	Abarca et Coll.(1994)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Abarca et Coll. (1994)
<i>Penicillium verrucosum</i>	Van Walbeek (1969) Scott et Coll. (1972) Pitt (1987) Skrinjar et Dimic (1992)
<u>Autres penicillium</u> <i>P. commune</i> <i>P. cyclopium</i> <i>P. variable</i> <i>P. verruculosum</i> <i>P. palitans</i> <i>P. expansum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. nordicum</i>	Scott et Coll. (1972) Ciegler (1972) Mills et Abramson (1982) Kribokov et Coll. (1987) Land et Hult (1987)

Parmi ces moisissures, deux sont essentiellement productrices de l'OTA. Il s'agit d'*Aspergillus ochraceus* et de *Penicillium verrucosum*. Ces moisissures toxigènes 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, 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, 1991). Au contraire, *Penicillium viridicatum* croit dans une gamme de température qui varie de 4°C à 30°C en présence d'une humidité de 22% (Mislivec, 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, 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 (JEFCA, WHO, 2002). L'OTA se formerait préférentiellement sur les aliments plutôt acides (Cuero, 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, 1976).

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, 1990) 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 des effets toxiques (Molinie, 2004).

III - 2 - Production de l'Ochratoxine A 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.

III -2- 1- Culture en milieu liquide

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

III 2- 1-1- La température

La température est un facteur déterminant pour la croissance du champignon et la production de mycotoxine. (Sansing, 1973) ont montré que la température optimale de production d'OTA à partir d'une culture d'*Aspergillus* varie entre 20° et 25°C.

III-2- 1- 2-Le pH et le temps d'incubation

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, 1973).

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).

III- 2-1-3-Oxygénation et substrat

Le degré d'oxygénation influence également la production d'OTA (Sansing, 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, 1993).

III - 2 - 2 - Culture en milieu solide

De nombreux travaux réalisés sur la production d'OTA à partir de cultures d'*Aspergillus ochraceus* et de *Penicillium verrucosum* effectuées sur différentes graines de céréales (maïs, seigle, orge, blé, avoine...), montrent que toutes les souches ne sont pas également toxigènes et qu'une souche toxigène peut perdre cette propriété après plusieurs repiquages (Galtier, 1973). En 1975, Lindenfelser et Ciegler, ont obtenu un rendement de 4mg/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.

III - 3 - Biosynthèse de l'Ochratoxine A

L'OTA est la condensation d'un noyau isocoumarinique avec un acide aminé : la phénylalanine.

En 1970, d'après Steyn, 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 al soutiennent plutôt que le noyau isocoumarinique est la résultante de la condensation d'unités acétate 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.

IV - TOXICOCINETIQUE DE L'OHTRATOXINE A

IV - 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 P, 1981). Cependant, une faible quantité est absorbée au niveau de l'estomac. 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, 1984). 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 P, 1981). Elle est ensuite distribuée aux différents organes via le système porte à partir du foie (Kumagai et Aibara K., 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, Kumagai 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, 1976).

IV - 2 - Distribution

IV - 2 - 1 - 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, 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, 1979) 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, 1979). 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. 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, 2000). Elle est de 21 jours chez le singe, 72-120 heures chez le porc, 55-120 heures pour le rat, 24-29 heures pour la souris (Zepnik,2003). (Tableau II)

L'OTA possède un cycle entérohépatique responsable en partie de sa très longue demi-vie dans l'organisme (Fuchs. et, Roth, 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)
Souris	24-39	Fukui et coll. (1987)

IV - 2 - 2 - 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, 1987 ; Galtier P, 1974). La distribution tissulaire, que ce soit pour le porc, le poulet ou la chèvre, suit en général l'ordre suivant : reins > foie et muscles > graisses (Harwig 1983 ; Mortensen, 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 fœto-placentaire et était transmise de la mère aux fœtus (Fukui, 1992). L'OTA passe également dans le lait.

IV - 3 - Métabolisme

IV - 3 - 1 - Métabolisme du groupement Phénylalanine

IV-3 -1-1Hydrolyse de la liaison peptidique

In vitro, l'OTA est hydrolysée en O α et en phénylalanine par des enzymes protéolytiques de digestion : l' α – chymotrypsine et la carboxypeptidase (Pitout, 1969). Le groupement phénylalanine permet à l'OTA d'être guidée vers les cibles cellulaires ce qui expliquerait le peu de toxicité de l'O α (Xiao H, 1996). Ainsi l'O α est dénuée de toxicité aiguë mais conserve une partie de la génotoxicité de la molécule de départ (Föllmann, 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, 1977), voire inexistante dans les hépatocytes de rat (Hansen, 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 O α .

D'après (Storen ,1982), la présence d'OT α serait due à un phénomène de réabsorption à partir de l'intestin où se forme ce métabolite.

IV-3-1-2-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, 1993 ; Stormer, 1983).

IV-3-2 -Métabolisme du groupement isocoumarinique

IV-3-2 -1-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, 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 toxique que l'OTA chez l'animal. Ils ont également constatés 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.

IV-3-2 -2-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. Trois métabolites hydroxylés ont été identifiés (figure 4) :

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

Ces 2 métabolites peuvent aussi être générés par les microsomes de reins

(Hietanen, 1986) et dans des cultures de reins de singe. Ils sont des métabolites moins toxiques que l'OTA (Creppy, 1983 ; Stormer, 1983).

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

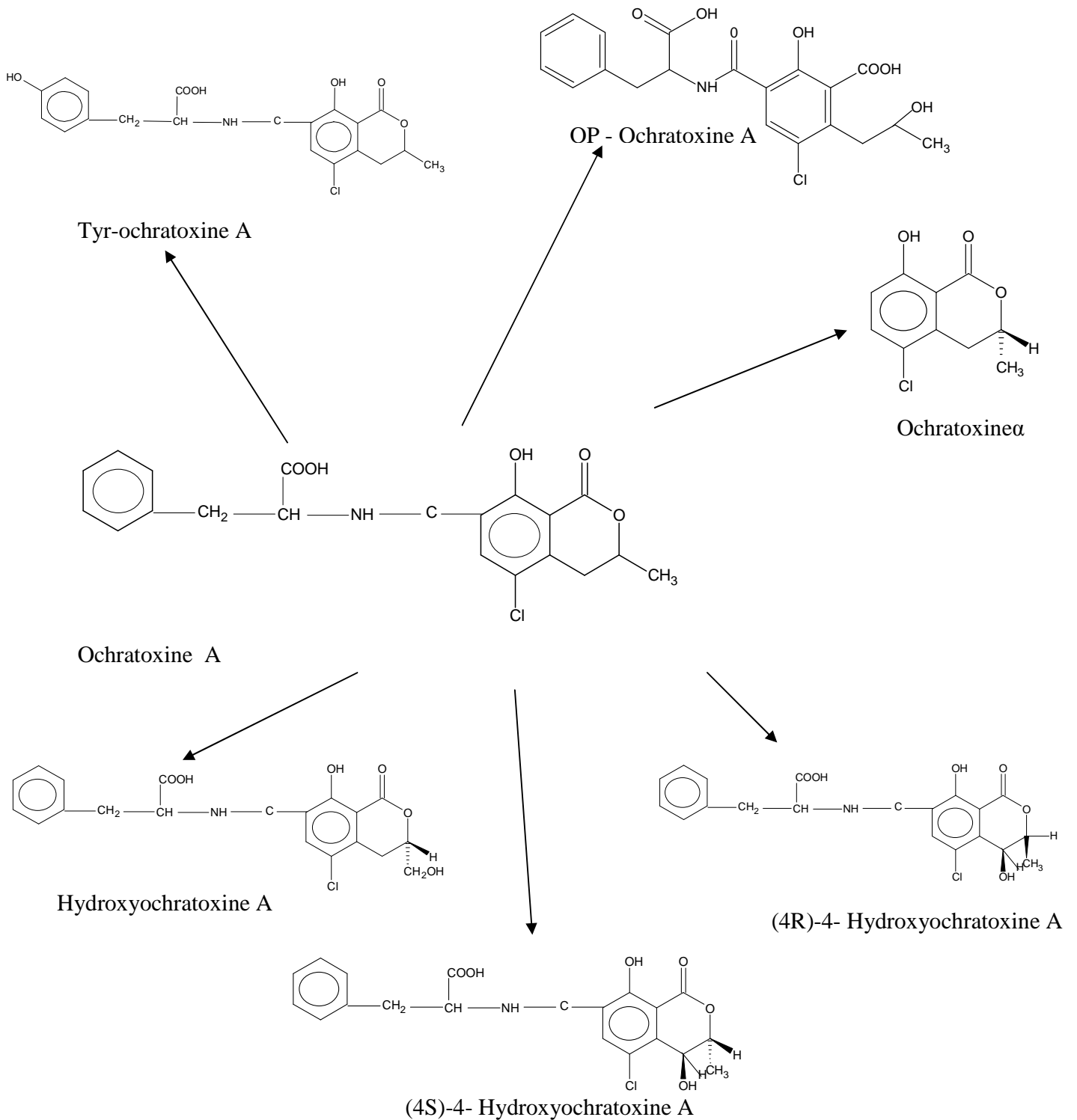


Figure 4 : Dérivés hydroxylés de l’Ochratoxine A produits par les Cytochromes – P450 et la phénylalanine hydroxylase

IV - 3 - 3 - Métabolisation de l'OTA par conjugaison au Glutathion

La voie de métabolisation par conjugaison au glutathion est généralement considérée comme une voie de détoxification (Jakoby, 1980). Néanmoins, certains dérivés provenant de la conjugaison au glutathion génèrent des composés électrophiles pouvant être mutagènes et cancérogènes (Dekant, 1980 ; Van blanderen, 1980). De plus, il est évident que l'accumulation de conjugués du glutathion peut être néphrotoxique dans certains cas (Monks, 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, 1993) 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.

IV - 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-Leskowicz, 1993).

IV - 4 - Excrétion de l'Ochratoxine A 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'OT α (Storen O, 1982).

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 S, 1977)

Une partie de l'OTA qui se retrouve dans la bile peut être réabsorbée au niveau de l'intestin (Fuchs R. et coll., 1988). 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 O, 1982). 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, 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 excrétion et réabsorption au niveau du tube contourné proximal, jouent un rôle important dans la clairance corporelle totale de l'OTA (figure 5). 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.

La pharmacocinétique d'élimination de l'OTA et de ses métabolites a été étudiée chez le rat (Li, 1997). Ainsi, les demi-vies d'élimination respectives de :

- ✓ l'OTA = 103 ± 16 heures
- ✓ l'OP-OTA (lactone ouverte) = $50 \pm 2,8$ heures
- ✓ l'OT α = $9,6 \pm 2,3$ heures
- ✓ la 4-OH-OTA = $6 \pm 0,9$ heures
- ✓ l'OTB (OTA déchloriné) = $4,2 \pm 1,2$ heures

✓ l'OTC (ester éthylique de l'OTA) = $0,6 \pm 0,2$ heures

L'OTA, l'OTB et l'OT α sont essentiellement éliminées par les urines (> 48%), la 4-OH-OTA par la bile (41%) et l'OP-OTA comme métabolite (43%).

Nous pouvons en conclure que l'OTA est éliminée très lentement alors que ses métabolites le sont nettement plus rapidement.

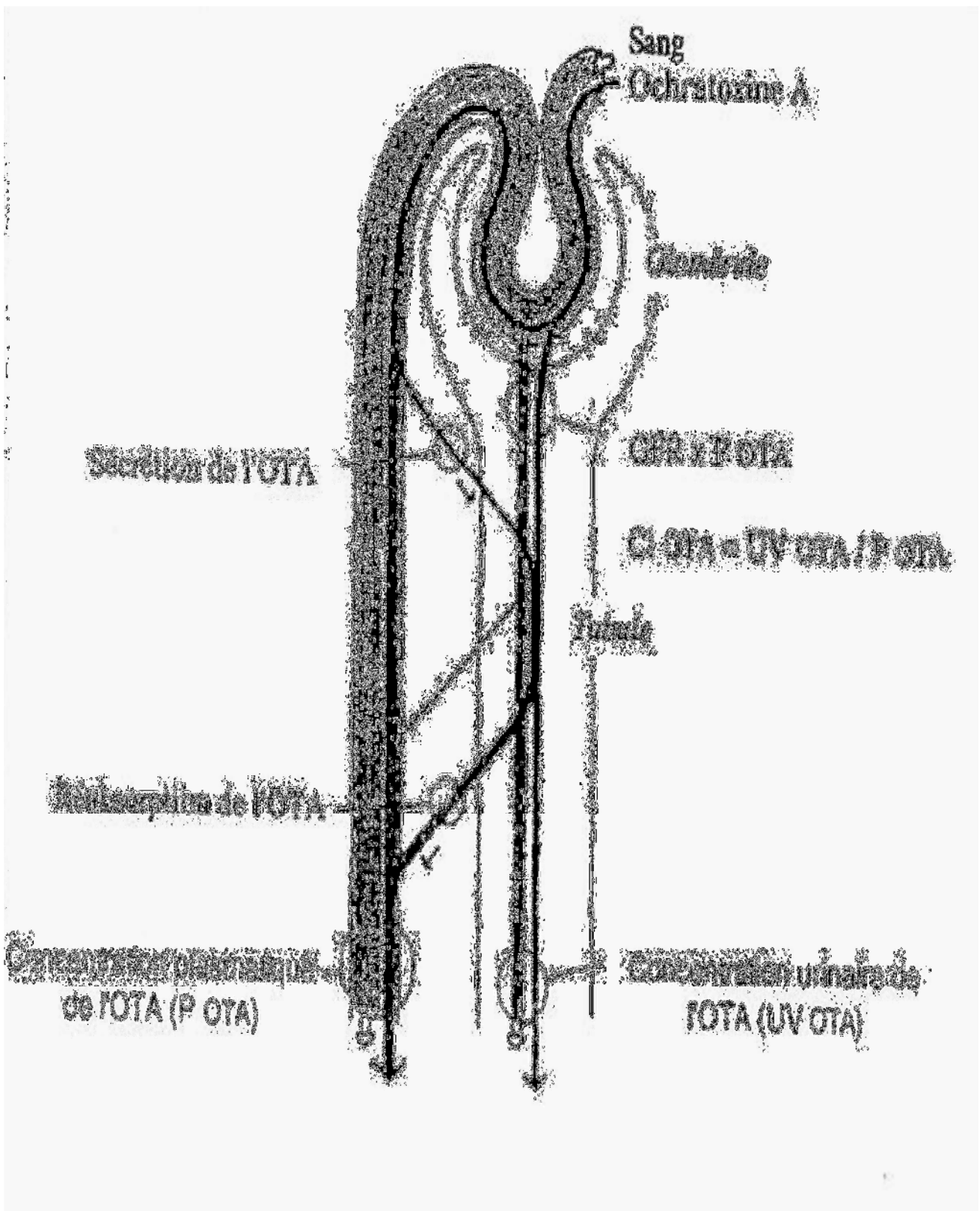


Figure 5 : Excrétion tubulaire de l'Ochratoxine A (Galtier, 1974)

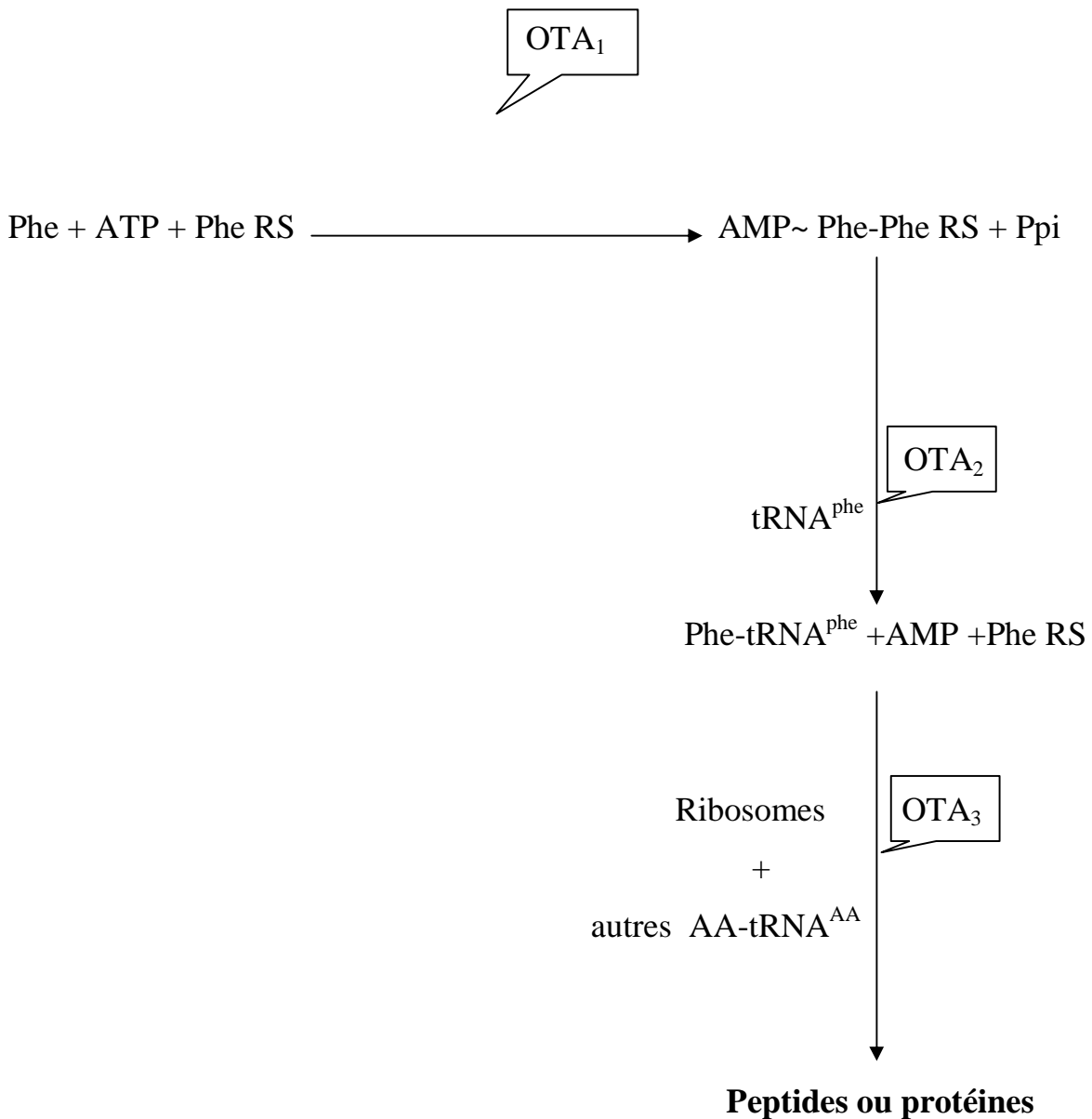
V - MECANISME D'ACTION DE L'OTA

V -1- 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 6) (Bunge, 1978 ; Creppy, 1983). Il en résulte un arrêt de la réaction d' amino-acylation et l'élongation peptidique. La synthèse d'ARN messenger peut également être inhibée (Meisner, 1983). Ce mécanisme d'action a été démontré aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes. C'est l'équipe du professeur Röschenthaler (1988) qui 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, 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, 1979) 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 : Effets de l'Ochratoxine A sur la synthèse des protéines.

V - 2 - Action sur le métabolisme glucidique

L'OTA entraîne une baisse de 25% de la néoglucogénèse 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, 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 néoglucogénèse (Krogh, 1988 ; Meisner, 1983). Ceci étant l'OTA inhibe donc la néoglucogénèse 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, 1998).

V - 3 - Perturbations oxydatives (Peroxydation lipidique)

(Omar, 1990) 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, 1990 ; Rahimtula, 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 7) (Esterbauer, 1993 ; Van Ginkel, 1994 ; Wagner, 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.

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.

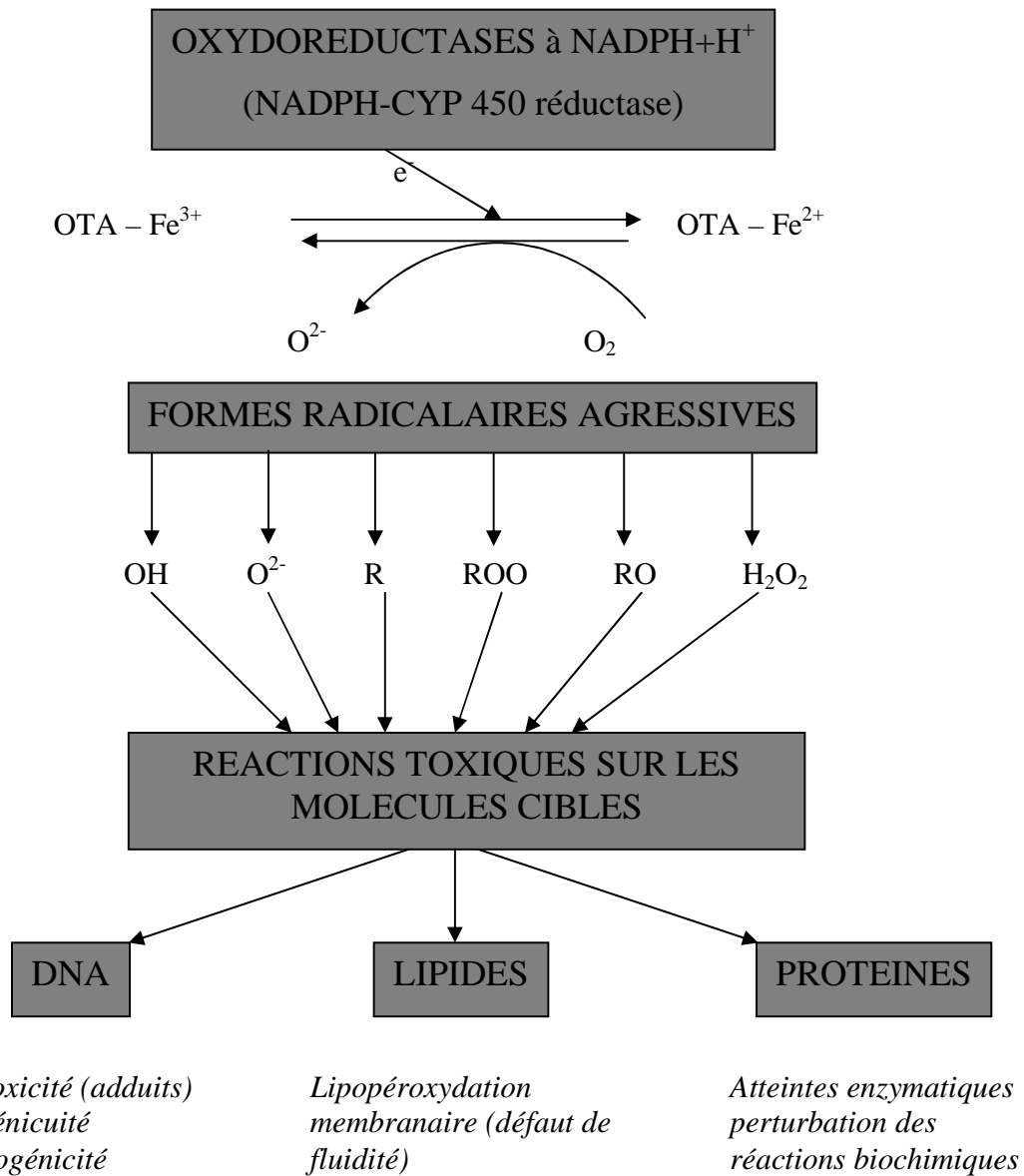


Figure 7 : Formation de dérivés radicalaires de l'Oxygène et effets toxiques au niveau cellulaire

V- 4 - Action sur la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est diminuée in vitro à la suite d'exposition à l'OTA. Ceci est dû à une altération des transporteurs de phosphate de la membrane mitochondriale et à une inhibition de l'activité ATPasique de la membrane interne de la mitochondrie. L'OTA inhibe compétitivement les activités de la succinate déshydrogénase, la succinate cytochrome C réductase et la succinate oxydase mitochondriale de rat (Wei, 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.

V - 5 - Action sur le métabolisme calcique

Les effets toxiques de l'OTA, principalement la néphropathie, sont en partie liés à la mobilisation du calcium intracellulaire (Rahimtula, 1986).

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, 1992).

V - 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, 1994 ; Creppy, 1980). Un phénomène de synergie avec l'OTA peut donc se produire et compliquer l'attribution à la seule OTA de ses effets toxiques (Pohland, 1992).

VI - ETUDE TOXICOLOGIQUE CHEZ L'ANIMAL

VI - 1 - Toxicité aiguë

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 (DL₅₀) de plusieurs espèces animales selon diverses voies d'intoxication (Kuiper, 1993), ces facteurs varient selon l'espèce animale, la voie d'administration et le sexe.

Tableau III : DL₅₀ de l'Ochratoxine A chez différentes espèces animales

Animal	DL50 (mg/kg de poids)	Voie d'administration
Souris swiss	51-68	Voie orale
Souris femelle	22	Voie intrapéritonéale
Rat (male et femelle)	28 et 21,4	Voie orale
Rat (male et femelle)	12,6 et 14,3	Voie intrapéritonéale
Rat (nouveau-né)	3,9	Voie orale
Cobaye (male et femelle)	9,1 et 8,1	Voie orale
Poulet	3,3	Voie orale
Porc	1	Voie orale
Chien	0,2	Voie orale

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, 1993) ont décrit un cas d'intoxication aigüe par inhalation d'*Aspergillus ochraceus*, ayant provoqué une atteinte rénale (oligurie et tubulonécrose). Les toxicoses aigües se caractérisent 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 aigüe, des modifications enzymatiques ont été décrites.

Chez l'homme, l'intoxication aigüe par l'OTA n'a pas encore été prouvée.

VI - 2 - Toxicité subaigüe 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 subaigüe 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. Des études de toxicité subaigüe chez certains animaux, ont montré :

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

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

Espèces	Voie	Dose (mg/kg /PC) [mg/kg aliment]	Temps jours)	Effets	Référence
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	Intrapéritonéale	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	$8 \cdot 10^{-3}$, 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)

VI - 3 - Toxicité chronique

Elle 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 voire 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.

VII - PRINCIPAUX EFFETS BIOLOGIQUES

VII-1- OTA et santé animale

VII-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, 1974 ; Petkova, 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, 1976 ; Krogh, 1974).

VII-1-1-1-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 A, 1986 ; 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. 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, 1986).

VII-1-1-2-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 ; Wagner, 1994 ; Sandor G, 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 0,041mg/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).

L'altération de la fonction rénale se caractérise également par une polyurie, une protéinurie, une glycosurie, une urémie et une augmentation des enzymes urinaires.

VII-1-1-3-Néphropathie chez la volaille

Chez le poulet, des lésions rénales associées à l'ingestion de l'OTA ont été observées (Elling, 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 aigüe avec gonflement des cellules épithéliales tubulaires et dépôts de protéines dans la partie luminale.

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).

VII - 1 - 2 - Effets sur la coagulation

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

VII - 1 - 3 – Immunotoxicité

L'OTA affecte à la fois la réponse à médiation cellulaire et humorale. En effet, Lea et al (Lea, 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, 1987).

Cet effet immunosuppresseur est dose-dépendant mais la dose reste toutefois inférieure à celle qui provoque la néphropathie. L'OTA 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, 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, 1992 ; Lea, 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, 1984).

Chez les cobayes ayant reçu de l'OTA à 5,6 mg/kg de poids corporel, on observe une nécrose et des œdèmes des ganglions lymphatiques, de la rate et du thymus ainsi qu'une leucopénie (Hagelberg, 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 immunosuppresseur 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 1µg/ml) (Creppy, 1982).

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 Lea, 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, 1983).

VII - 1 - 4 - Neurotoxicité

Les effets neurotoxiques de l'OTA se manifestent au niveau de toutes les structures du système nerveux central. (Bruinink ,1997) ont montré que l'OTA était hautement toxique 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 (Braudeau, 1969).

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 glutamyltransférase 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, 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 a sa partie isocoumarinique (Bunge, 1979).

VII - 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, 1976 ; Hayes, 1974 ; Mayura, 1982).

L'administration d'OTA par voie intra péritonéale (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, 1976). On observe également des retards psychomoteurs et des modifications du comportement (Poppe, 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, 1974). L'OTA provoque aussi une nécrose des cellules cérébrales et une microcéphalie (Gareis, 1996).

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, 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 d'ADN, d'ARN, de protéines et de monoamines telles que la dopamine, la noradrénaline et la sérotonine (Fukui, 1992).

Il a été démontré que l'OTA administrée à la rate passe le placenta et s'accumule dans les tissus fœtaux d'où son effet direct sur l'embryon (Ballinger, 1986).

VII - 1 - 6 - Génotoxicité et mutagénicité

L'évaluation de la génotoxicité d'un xénobiotique peut être effectuée à l'aide de différents tests, tels que la mesure de la mutagénicité par le test de AMES, la mesure d'échange de chromatines sœurs, la détection des cassures simple-brin de l'ADN, la formation de micro noyaux (Ashby, 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 de AMES réalisé sur différentes souches de *Salmonella typhimurium*). Par la suite, une activité mutagène a été observé 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, 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.

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

VII- 1-6 -1-Cassures simple-brin du DNA

Une administration intrapéritonéale d'OTA à des souris Balb/c, soit à forte dose en une fois, soit à faibles doses répétées, provoque une cassure réversible au niveau du DNA de rein, de foie et de rate. Ces observations mises en évidence par la technique de l'élution alcaline, indiquent les sites de labilité sur la molécule du DNA (Creppy, 1985).

Par contre, dans le cas d'un traitement à long terme, ces cassures peuvent persister longtemps après l'arrêt de l'administration de la toxine.

VII -1- 6- 2-Adduits à l'ADN.

Une méthode très sensible permettant la détection des adduits à l'ADN a été développée en 1986 par Reddy et Randerath. La technique appliquée à la souris et au rat indique que l'OTA induit la formation de nombreux adduits à l'ADN de manière dose-dépendante (Pfohl-Leszkowicz, 1991). Ainsi, pour comprendre la génotoxicité de l'OTA, la formation d'adduits à l'ADN suite à l'administration de 2,5 mg/kg d'OTA à des souris, et leur disparition ont été testées par la méthode de post-marquage au phosphore 32 (³²P) qui est une méthode très sensible de détection des adduits à l'ADN. Dans l'ADN de rein, de foie et de rate, plusieurs adduits ont été observés 24 heures après une administration unique d'OTA. Cependant, leurs taux varient significativement suivant l'organe et en fonction du temps. Le rein est l'organe cible pour la génotoxicité comme il l'est pour la carcinogénicité. Tous les adduits disparaissent au bout de 5 jours dans le foie et la rate alors que quelques adduits persistent dans le rein au delà de 16 jours après administration de l'OTA. Certains adduits sont spécifiques de l'organe et l'espèce. Dans le but de mettre en évidence le rôle de l'OTA dans l'étiologie de cancers humains de rein et de la vessie, l'ADN de personnes souffrant de néphropathie endémique des Balkans et ayant été exposées à l'OTA, a été analysé. Plusieurs adduits ont été détectés.

VII-1- 6 -3-Aberrations chromosomiques.

Des échanges de chromatines sœurs ont été induits in vitro mais pas in vivo, avec des doses couvrant les doses cytotoxiques. Les aberrations chromosomiques sont fonctions des cellules étudiées. On a pu induire une aberration chromosomique sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence d'OTA et les micro-nucléides ont été induits dans les cellules de la vésicule séminale ovine et les fibroblastes de l'embryon du hamster syrien (Kumagai, 1988).

VII - 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 à cause de l'air ambiant qui est contaminé (Di Paolo, 1993). L'OTA peut avoir une longue durée de demi-vie chez les humains et résiste aux traitements culinaires ordinaires. Les premières études pour relier la néphropathie endémique des Balkans (NEB) à l'exposition de l'homme à l'OTA par mesure des teneurs en cette mycotoxine dans le sang ont débuté en ex -Yougoslavie. Dès 1982, Hult et al 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 (Creppy, 1991 ; Betina V., 1994). Ces résultats suggèrent une corrélation entre l'exposition à l'OTA, l'incidence de la NEB 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 touchetous 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, 1991 ; Creppy, 1993).

Tableau V : Teneur en Ochratoxine A dans le sang et le lait chez l'homme

Echantillons biologiques	Taux de contamination	Pays	Références
Serum	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	0,44 ng/ml	Italie	-Breithotz-Emanuelson et coll, 1994
Lait maternel	0,1 – 12 pg/ml		-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

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

Tableau VI : Teneur en Ochratoxine A dans le sang à Abidjan (Côte d'Ivoire) (Sangaré, 2006)

Catégorie de personne	effectif	Pourcentage de contamination	Intervalle 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

VII - 2 - 1 - Néphropathie aigüe chez l'homme

Une néphropathie aigüe paraît exceptionnelle. La seule observation disponible semble être celle décrite par Di Paolo (1993) concernant le cas d'insuffisance rénale aigüe 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 aigüe à diurèse conservée (créatinine sanguin 64 mg/l, clairance de la créatine 9ml/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 aigüe 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.

VII - 2 - 2 - Néphropathie endémique des Balkans (NEB)

L'observation la plus récente, 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. 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, 1987 ; Creppy, 1991 ; Krogh, 1974 ; Petkova, 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 NEB n'était encore qu'à l'état d'hypothèse.

En 1993, un élément nouveau est venu renforcer l'hypothèse de cette implication. En effet, l'étude de Pfohl-Leszkowicz (1993) a montré la ressemblance entre les adduits à l'ADN 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 NEB.

Récemment, des spécialistes Croates, les Docteurs Sostaric et Plestina J. ont constaté, après une visite à la clinique de néphrologie du CHU de Monastir (Tunisie), une analogie entre les coupes histologiques effectuées sur les reins des patients OTA-positifs présentant une néphropathie interstitielle chronique et des coupes provenant des patients croates, atteints de NEB.

VII - 2 - 3 - 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. 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, 1979). 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, 1979).

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.

VIII – DETECTION 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 puis du dosage. Un certain nombre de techniques ont été proposées pour la détermination de l'OTA.

VIII - 1 - Dosage de l'OTA par Chromatographie sur Couche Mince

La technique de chromatographie sur couche mince, mise au point par Nesheim S. (1973), a été adoptée officiellement par l'Association of Official Analytical Chemist (AOAC) 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, 1982).

VIII - 2 - Dosage de l'OTA par Chromatographie Liquide Haute

Performance (HPLC)

Les méthodes HPLC, développées par Bauer et Gareis (1987); Nesheim ,1973; Nesheim,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.

VIII - 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 (1979), consiste à scinder par la carboxypeptidase, l'OTA en O 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'O α , ainsi que sur la disparition de l'OTA parallèlement à l'apparition de l'O α avec un temps de rétention très faible.

VIII - 4 - Méthodes de couplage avec la Spectrométrie de masse

Le couplage HPLC-Spectrométrie de masse (HPLC-MS) a été utilisé par Abramson D. (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, 1992).

VIII - 5 - Méthodes immunologiques

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

IX-MOYENS DE PREVENTION CONTRE L'INTOXICATION PAR L'OTA

IX - 1 - Détoxification de l'OTA

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

IX-1-1-Traitements physiques

IX-1-1-1-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.

IX-1-1-2-Effets de l'irradiation par les rayons gamma sur la production d'Ochratoxine A en milieu liquide et solide

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'ya plus de production d'OTA. 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 ya environ 75% de réduction de la quantité d'OTA produite. Mais cet effet n'évolue pas en fonction de la quantité de radiations ionisantes.

IX-1-1-3-Effet de la congélation sur la production d'OTA

Lorsque les inocula sont congelés à -20°C , puis décongelés de façon répétée, 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-décongelations. 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 décongelations, aucun effet n'est observé.

IX-1-1-4-Effets 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 (Fuchs , 1988 ; Trenk, 1991). Un autoclave 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 pendant 10 minutes, 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 (stabilité encore plus accrue en atmosphère humide) en raison de sa liaison peptidique qu'une action conjuguée de traitements physiques et chimiques pourrait peut être altérer .

IX - 1 - 2 - Traitements chimiques

Les méthodes utilisées pour la détoxification des céréales sont essentiellement basées sur des traitements par l'Ammoniac. Chelkowski (1982) ont montré qu'un traitement de grains de maïs par une solution d'ammoniacale 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 .

IX - 1 - 3 - Combinaison de traitements chimique et physique.

Un procédé de détoxification a été mis au point par Madsen en 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 de 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 O_α et en phénylalanine selon une réaction semblable à celle de la carboxypeptidase. Cependant pour obtenir une complète détoxification, de forts pH sont nécessaires (pH 10 – 12) (Trivedi, 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, 1992).

IX- 1-4-Traitements enzymatiques

IX- 1-4-1-Effets de la carboxypeptidase sur la production de l'OTA

La carboxypeptidase, enzyme pancréatique qui hydrolyse l'OTA en O_α 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, 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.

IX- 1-4-2-Effets de l'uricase

Les résultats de Deberghes en 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.

IX-1-4-3-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. Elles 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.

IX - 2 - Utilisation des 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 (analogue structural 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.

IX-2-1- Effets protecteurs de la phénylalanine

IX-2-1-1-Effets antidotiques sur l'inhibition de la synthèse protéique

Etant donné que l'OTA agit comme un inhibiteur compétitif de la phénylalanine, (Creppy, 1979) 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 μ M de Phénylalanine et de 90 μ M 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.

IX-2-1-2-Effets de la phénylalanine sur la toxicité aigüe chez l'animal

Chez des souris traitées en intra-péritonéale 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, 1984 et 1980). 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 aminé est administré une heure après l'intoxication par la toxine. Ainsi, la phénylalanine peut prévenir une intoxication aigüe mortelle induite par l'OTA (Creppy, 1984).

IX-2-1-3-Effets de la phénylalanine sur l'immunosuppression

Chez la souris Balb/C, une administration intra-péritonéale 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, 1983 ; Haubeck, 1981).

IX-2-1-4-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, 1982).

IX-2-1-5-Prévention partielle de la néphrotoxicité

Chez des rats traités par gavage pendant 4 semaines avec 145µg 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 (1,45mg/kg/j) et avec l'OTA (145 µg/kg/j) (Kane, 1986)

IX-2-1-6 -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, 1988). On constate en effet :

- une augmentation de l'absorption stomacale 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 OTα par la microflore
- une forte atténuation du cycle entérohépatique (réduction de la demi-vie plasmatique), probablement le résultat d'une compétition entre l'OTA et la phénylalanine au niveau de la réabsorption intestinale

- une augmentation des éliminations urinaire et biliaire ; cette augmentation serait la conséquence du déplacement par la phénylalanine de la toxine de ses liaisons avec l'albumine (complexe OTA-protéine).

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).

IX - 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 monobrins et souvent des aberrations chromosomiques. L'administration simultanée de rétinol et d'OTA (à une dose double de la dose thérapeutique usuelle) réduit de façon significative chez la souris, ces effets génotoxiques induits par l'OTA (Kumari et Sinha, 1994). Actuellement, le mécanisme d'action due à la vitamine A en qualité d'agent protecteur n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs hypothèses sont énoncées parmi lesquelles, la plus probable serait liée aux propriétés antioxydantes du rétinol. En effet, le rétinol, en tant qu'antioxydant piègeur de radicaux libres, empêcherait la formation de radicaux électrophiles et inhiberait par conséquent la fixation à l'ADN.

Cette vitamine pourrait également intervenir suivant d'autres modes d'action :

- éliminer la distribution de la toxine au niveau des organes cibles
- être à l'origine d'un mécanisme de partition intracellulaire
- éliminer les métabolites réactifs de la cellule

La vitamine A, de même que la vitamine E possédant des propriétés antioxydants pourraient jouer un rôle protecteur vis à vis des effets chroniques de l'OTA.

IX - 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, 2002). 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, 1994). L'effet protecteur de la vitamine C est particulièrement important au niveau de la division cellulaire.

IX - 2 - 4 - Effets protecteurs du Bicarbonate de Sodium (Na HCO₃)

(Yong, 1987) ont montré que, chez le rat, 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) accroît 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. 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.

IX - 2 - 5 - Effets protecteurs de la cholestyramine

Le cycle entéro-hépatique 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, 1988).

Cette résine échangeuse d'ions 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'excrétion 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.

X - PRESENCE NATURELLE DE L'OCRATOXINE A DANS LES PRODUITS VEGETAUX 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 à l'origine de la contamination humaine.

Les services de contrôle des Etats 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 sa présence également dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes. On la retrouve aussi dans la bière (El-Dessouki, 1992), 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).

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

Tableau VII : Fréquence et taux de contamination en OTA de divers aliments dans l'Union Européenne (D'après SCOOP Task 3.2.7, European, 2002)

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

a Sur la totalité des échantillons.

b Sur les échantillons positifs

c Inclus café soluble et décaféiné

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

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

Tableau VIII : Résultats de l'analyse préliminaire de l'Ochratoxine A dans les aliments en Côte d'Ivoire (Sangaré, 2006)

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

XI - OCHRATOXINE A ET LEGISLATION

La législation fixe des teneurs en mycotoxine à ne pas dépasser et précise entre autre chose que les lots fortement contaminés ne peuvent pas être mélangés à des lots sains dans l'objectif de diminuer le niveau final de contamination.

En 1990, différentes propositions ont été avancées notamment au Brésil, en Tchécoslovaquie, au Danemark, en France, en Grèce, en Hongrie, en Israël, en Hollande, en Roumanie, en Suède, en Angleterre à la suite desquelles la limite acceptable a été fixée entre 1 et 50 ng/g pour les denrées alimentaires et entre 100 et 1000 ng/g pour les produits destinés à l'alimentation animale. Cependant, dans certains pays, de telles réglementations peuvent poser de graves préjudices aux produits, ce qui à pour conséquence de réviser les seuils à la hausse. Il serait donc souhaitable d'établir une réglementation internationale.

En 1990, le comité conjoint des experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires JECFA (Joint Expert Committee on Food and Additives) a fixé, pour l'OTA, la dose tolérable hebdomadaire provisoire (DHTP) : la dose pouvant être consommée chaque semaine au cours de la vie entière sans incidence sur la santé du consommateur. Celle-ci a été fixée à 112 ng/kg de poids corporel, qui correspond à une dose journalière de 16 ng/kg de poids établie exclusivement en relation avec l'apparition d'effets néphrotoxiques. Cette valeur ne prend pas en compte les données génotoxiques et carcinogéniques dont les doses journalières sont fixées à 5 ng/kg de poids corporel (Kuiper, 1993). Afin d'évaluer de manière directe le degré d'exposition de l'homme à la toxine, la surveillance des taux sériques a également été proposée. La recherche systématique d'OTA dans le sang de personnes saines a été entreprise en Allemagne, en Suède et dans les Balkans. Les résultats provisoires montrent qu'un nombre important de personnes (plus de 40%) présente de l'OTA à des taux allant jusqu'à quelques ng/ml.

En France, un travail de même ordre entrepris dans le cadre d'un projet Lyon-Bordeaux-Strasbourg a révélé que les taux sériques décelés chez l'homme sont en moyenne légèrement inférieurs à ceux qui ont été décelés dans les pays d'Europe du Nord (0,1 à 6 ng/ml contre 2 à 11 ng/ml) (Creppy, 1993).

Dans les Balkans, des taux sériques supérieurs à 100 ng/ml ont été mis en évidence. Il apparaît par conséquent indispensable de poursuivre ces travaux afin de déterminer les risques réels encourus par les personnes OTA-positives, sachant qu'il est nécessaire au préalable de normaliser les techniques de dosage.

Le 4 avril 2006, le groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs), à la demande de la Commission a adopté un avis scientifique actualisé sur l'ochratoxine A (OTA) dans les aliments dans lequel, sur la base des nouvelles informations scientifiques disponibles, une dose hebdomadaire tolérable de 120 ng/kg de poids corporel a été établie.

Le 18 novembre 2003, conformément à un document de travail du Comité expert sur les "Contaminants de l'Agriculture" à propos de la régulation de l'OTA, il existe les propositions suivantes pour la régulation sur le cacao matière première pour la transformation des denrées alimentaires (fève de cacao, amandes décortiquées, pâte de cacao, tourteau de cacao et cacao en poudre, 2 µg/kg).

Le 19 Décembre 2006, compte tenu des nouvelles exigences de qualité sanitaire, le règlement CE n° 1881/2006 de la Commission Européenne fixe les limites maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, notamment celle de l'OTA de 5 µg/kg dans les grains de café torréfié et de café torréfié moulu ; de 10 µg/kg dans le café soluble (café instantané). La commission juge également opportun de mener des investigations afin de fixer ou non une teneur maximale d'OTA dans le cacao et produits à base de cacao.

Le 5 février 2010, le règlement (UE) N°105/2010 de la commission modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne l'ochratoxine A stipule en son paragraphe 5 :

Au vu des informations disponibles, il ne semble pas nécessaire, pour protéger la santé publique, de fixer une teneur maximale en OTA pour le cacao et les produits à bases de cacao, puisque ces denrées ne contribuent pas considérablement à l'exposition à l'OTA et que des teneurs élevées en OTA n'ont été que rarement décelées dans ces denrées.

XII - GENERALITES SUR LE CACAO

XII - 1 - Origine et découverte du cacao

Le cacaoyer était utilisé en Amérique centrale par les Mayas et les Aztèques bien longtemps avant l'arrivée des Européens. C'est sous leur nom mexicain qu'Hernandez en 1630, donna la première description botanique de l'arbre (Cacahoquahuitl), de ses fruits (Cacahoacentli) et de ses graines (Cacahoatl).

Le mot " cacao " qui est dérivé de la langue Maya et qui est universellement employé aujourd'hui, a fait pour la première fois son apparition dans la littérature botanique en 1605 sous la plume de Charles de l'Ecluse.

En 1700, Tournefort le retint comme nom de genre, mais Linnée en 1737, préfère lui substituer celui de *Théobroma*. C'est dans l'espèce "*Théobroma cacao*" décrite par Linnée, que se classent aujourd'hui tous les cacaoyers cultivés (Braudeau, 1969).

XII - 2 -Historique du cacao en Côte d'Ivoire

Le cacao a été introduit en Côte d'Ivoire depuis 1888 à Aboisso par Verdier et Bretignierds. Et depuis, la culture du cacaoyer occupe aujourd'hui une place importante dans l'économie ivoirienne. A l'origine, les zones de plus fortes productions étaient celles de l'Est et le Centre-Est. Ces régions constituaient alors « la boucle du cacao ». Suite aux changements climatiques et à l'appauvrissement des sols, un nouveau front de culture s'est développé vers l'Ouest, sous la poussée de flux migratoire, aussi bien d'origine intérieure (Centre, Centre-Est, Nord) qu'extérieure (pays de la sous-région). Par conséquent, la principale zone cacaoyère est aujourd'hui le Centre-Ouest, avec 36% de la production ivoirienne.

Le cacao représente aujourd'hui près de 10% du produit intérieur brut (PIB) et 40% des exportations, soit 1688 milliard de francs de CFA de recette en 2006 et 1809 milliard en 2007. Quant à la production, elle est passée de 725393 tonnes en 1990 à 1400000 tonnes en 2007. Au plan social, environ 6.000.000 de personnes vivent des revenus du cacao. La Côte d'Ivoire est le premier producteur mondial de cacao.

XII - 3 - Le cacaoyer : description botanique et caractéristiques techniques

Le cacaoyer (*Theobroma cacao*) est un arbre de la famille des *Sterculiaceae*. Il mesure 4 à 8 mètres de haut et vit en moyenne 25 à 30 ans en plantation. En forêt, il peut atteindre 10 mètres et vivre jusqu'à 40 ans et même plus dans un environnement favorable. Le cacaoyer est caractérisé par une tige droite, un bois clair de couleur blanchâtre et une écorce brune, fine et lisse mais qui s'épaissit en vieillissant. Comme de nombreux arbres tropicaux, il porte à la fois des boutons floraux, des fleurs et des fruits. Les feuilles sont d'âges différents et les poussées foliaires se produisent 4 à 5 fois par an ; chaque feuille a une durée de vie d'environ 1 an. Les fleurs naissent tout au long de l'année, mais sur des arbres de 3 ans au moins. Les fruits, appelés cabosses, sont accrochés aux troncs des arbres. La poche volumineuse est reliée à l'arbre par un court pédoncule. Il leur faut, suivant la variété, 5 à 7 mois pour atteindre leur plein développement. La couleur des cabosses évolue tout au long du développement du fruit. D'abord verte, elle vire au jaune lorsqu'elle se trouve à maturité, et pèse alors environ 400 à 500 g. Sur ce total, les fèves fraîches représentent de 100 à 120 g. La taille moyenne d'une cabosse est de 12 à 15 centimètres (cm) parfois 30 (cm) et contient environ 30 à 40 graines réparties en 5 rangées longitudinales. Ces graines de forme et de tailles variables, entourées d'une pulpe mucilagineuse blanchâtre, acidulée et sucrée, sont connues sous le nom de fèves. A cette étape, les graines sont encore très amères.

Il existe 3 variétés de cacao :

- ✓ La variété *Forastero* : plutôt amer, représente environ 90% de la production mondiale de fèves de cacao et est principalement cultivée en Afrique de l'Ouest et au Brésil.
- ✓ La variété *Criollo* : donne des fèves de type " cacao fin ". Son importance a diminué mais il est encore présent dans les Caraïbes, les Antilles, au Venezuela, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, au Sri Lanka, au Timor Oriental et en Indonésie.
- ✓ La variété *Trinitario* : hybride entre Criollo et Forastero, possède un arôme assez fin mais peu intense.

XII - 4 - Culture du cacao

Les cacaoyers ont besoin, pour pousser d'un climat chaud et humide. Ils poussent à l'ombre d'autres arbres. Ceci permet de préserver l'humidité nécessaire à leur croissance. Afin d'obtenir une efficacité optimum, les arbres destinés à protéger les cacaoyers du soleil doivent être plantés 6 à 9 mois avant le cacaoyer. Les conditions idéales à la production sont caractérisées par des précipitations comprises entre 1150 et 2500 millimètres par an, une température variant de 18°C à 32°C, une saison sèche inférieure à 3 mois et un sol profond, riche en matière organique. La période de maturation d'une cabosse, de la fécondation à la récolte, prend environ 5 à 7 mois. Les conditions climatiques et les risques pathogènes sont les principaux facteurs exogènes influençant la production.

La culture du cacao en Côte d'Ivoire se pratique, de manière générale, avec du petit matériel agricole. Elle n'est pas mécanisée. L'on a parfois recours à des outils modernes comme le pulvérisateur ou l'atomiseur pour les traitements phytosanitaires.

XII - 5 - Traitement post-récolte du cacao

XII - 5 - 1 - La récolte

Elle se fait à maturité. Une récolte tardive entraîne un risque de pourriture et de germination des fèves, par contre, une récolte précoce diminue le rendement (proportion excessive de fèves violettes ou ardoisées). La maturité s'apprécie par la couleur des cabosses (le vert vire au jaune, le rouge vire à l'orange).

Il existe généralement 2 grandes périodes de récolte dans les pays producteurs. Les cabosses sont alors cueillies à intervalles réguliers de 10 à 15 jours voir 21 jours au maximum. On utilise un couteau ou une machette pour les cabosses accessibles et un outil spécial, aux bords très tranchants, emmanché sur une longue perche pour atteindre les cabosses les plus hauts placés.

Il est important, au cours de la récolte, de :

- ne pas blesser l'arbre ou la cabosse, ce qui pourrait entraîner la prolifération de champignons parasites

- ne pas endommager le coussinet fructifère qui portera les récoltes à venir.

En cas de maladie, la cueillette est plus fréquente. Toutes les cabosses sont cueillies mais, parmi elles, seules les cabosses mures dont les fèves ne sont pas atteintes, sont mélangées à la récolte normale tandis que les autres sont éliminées.

XII - 5 - 2 - Ecabossage

L'écabossage a lieu au maximum dans les 2 à 4 jours qui suivent la cueillette. Les cabosses sont transportées à proximité du lieu où les fèves doivent être fermentées. Il consiste à retirer les fèves de leur fruit. Cette opération se fait à la main, à l'aide d'un gourdin ou d'une machette. Les fèves séparées du placenta, seront ensuite soumises à la fermentation.

XII - 5- 3 - Fermentation

Elle doit débiter au plus tard 24 heures après l'écabossage et dure en moyenne 5 à 7 jours. Elle a pour but de :

- débarrasser les fèves de la pulpe mucilagineuse
- empêcher la germination des fèves
- faire naître les précurseurs de l'arôme du chocolat

Pour y parvenir, les fèves sont mises en tas, enfermées dans un support qui les protège du milieu extérieur et doivent subir un brassage périodique.

La fermentation entraîne une élévation de température. Sous l'action des levures et bactéries, la pulpe mucilagineuse se décompose et produit un jus acide. Peu à peu, les graines passent du violet au marron. Cette étape permet d'éviter la germination des fèves de cacao, de réduire le goût amer et favorise la naissance des précurseurs de l'arôme du chocolat.

XII - 5 - 4 - Séchage

Après la fermentation, les fèves sont séchées pour ramener leur teneur en humidité de 60% à 6 ou 7%. L'humidité du cacao doit être maintenue à ce taux si l'on veut lui

assurer de bonnes conditions de conservation. Etalées au soleil sur des claies en bois, des aires cimentées, ou des bâches en plastique, les fèves sèchent durant 8 à 12 jours. Pour éviter la formation de moisissures, les fèves sont régulièrement retournées et ratissées. Le séchage permet également au cacao de développer tout son arôme.

XII - 6 - Problèmes de contamination du cacao par l'OTA

Le cacao est cultivé principalement en Afrique de l'Ouest, en Amérique Latine et en Asie. Les plus grand pays producteurs de cacao sont par ordre décroissant, la Côte d'Ivoire, l'Indonésie, le Ghana, le Nigeria, le Brésil, le Cameroun, l'Equateur. Le cacao est très largement produit dans les pays en développement et est essentiellement consommé en Europe, en Amérique de Nord, au Japon et à Singapour. Les fèves de cacao sont une source de recette d'exportation pour nombre de pays qui peuvent commercialiser le produit brut (fèves), ses dérivés (Liqueur, pâte, beurre, tourteau et poudre de cacao) et le produit final (chocolat).

Cependant, le secteur du cacao est menacé par la présence de l'OTA. Produite par des moisissures du genre *Aspergillus* et *Penicillium*, cette mycotoxine constitue un danger réel pour la santé humaine. Les pays membres de l'OMC (Organisation Mondiale du Commerce) ont adopté un certain nombre de règles pour assurer la protection de leurs consommateurs. Aussi, des dispositions légales et réglementaires ont été prises par la Commission Européenne pour le renforcement de la sécurité sanitaire des aliments. La réglementation du taux d'OTA dans le cacao, pourrait engendrer des conséquences néfastes pour les pays producteurs de cette denrée alimentaire.

La Côte d'Ivoire, premier pays exportateur de cacao, avec 1511000 tonnes de cacao en 2011 (Tableau IX) est donc concernée au plus haut niveau par la fixation des taux qui pourrait lui faire perdre des parts sur le marché européen. Ainsi, pour résoudre la problématique de l'OTA et limiter les conséquences pour l'économie ivoirienne de cette réglementation sanitaire européenne, la Côte d'Ivoire en collaboration avec l'Union Européenne (UE) a établi un programme de lutte contre l'OTA afin d'évaluer les conditions de sa production et les moyens de la contrôler voire de l'éradiquer.

Tableau IX : Principaux pays producteurs de fèves de cacao (en millier de tonnes)

	2010/2011		Estimation 2011/2012		Prévisions 2012/2013	
Afrique	3226	74,8 %	2905	71,3 %	2796	69,8 %
Cameroun	229		207		210	
Côte d'Ivoire	1511		1486		1470	
Ghana	1025		879		820	
Nigeria	240		230		210	
Autres	221		104		86	
Amérique	562	13,0 %	639	15,7 %	644	16,1 %
Brésil	200		220		230	
Equateur	161		190		190	
Autres	201		229		224	
Asie& Océanie	527	12,2 %	531	13,0 %	563	14,1 %
Indonésie	440		450		475	
Papouasie nouvelle Guinée	48		45		45	
Autres	39		36		43	
Total mondial	4314	100,0 %	4075	100,0 %	4003	100,0 %

Source : ICCO bulletin trimestriel de statistiques du cacao, Vol. XXXIX, No. 1, saison 2012/13
 Publié le: 28-02-2013

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE ET ANALYTIQUE

C'est une étude de type prospectif qui s'est déroulée de décembre 2008 à Avril 2009. Elle a porté sur le dosage de l'OTA dans des échantillons de fèves de cacao provenant des localités d'Abengourou, Gagnoa et San Pedro.

L'étude s'est déroulée en deux étapes principales :

- Une étape préliminaire consacrée à la collecte des échantillons.
- Une étape analytique consacrée au dosage de l'OTA dans les fèves de cacao.

I-COLLECTE DES ECHANTILLONS

I - 1 -Materiels

- Machettes pour la récolte des cabosses de cacao
- Gourdins pour l'écabossage
- Cuvettes de ramassage des cabosses
- Sachets en plastique pour les prélèvements
- Bâches noires pour le séchage
- Feuilles de bananier pour la fermentation
- Sacs en jute pour le stockage des échantillons secs
- congélateur pour la conservation des échantillons.

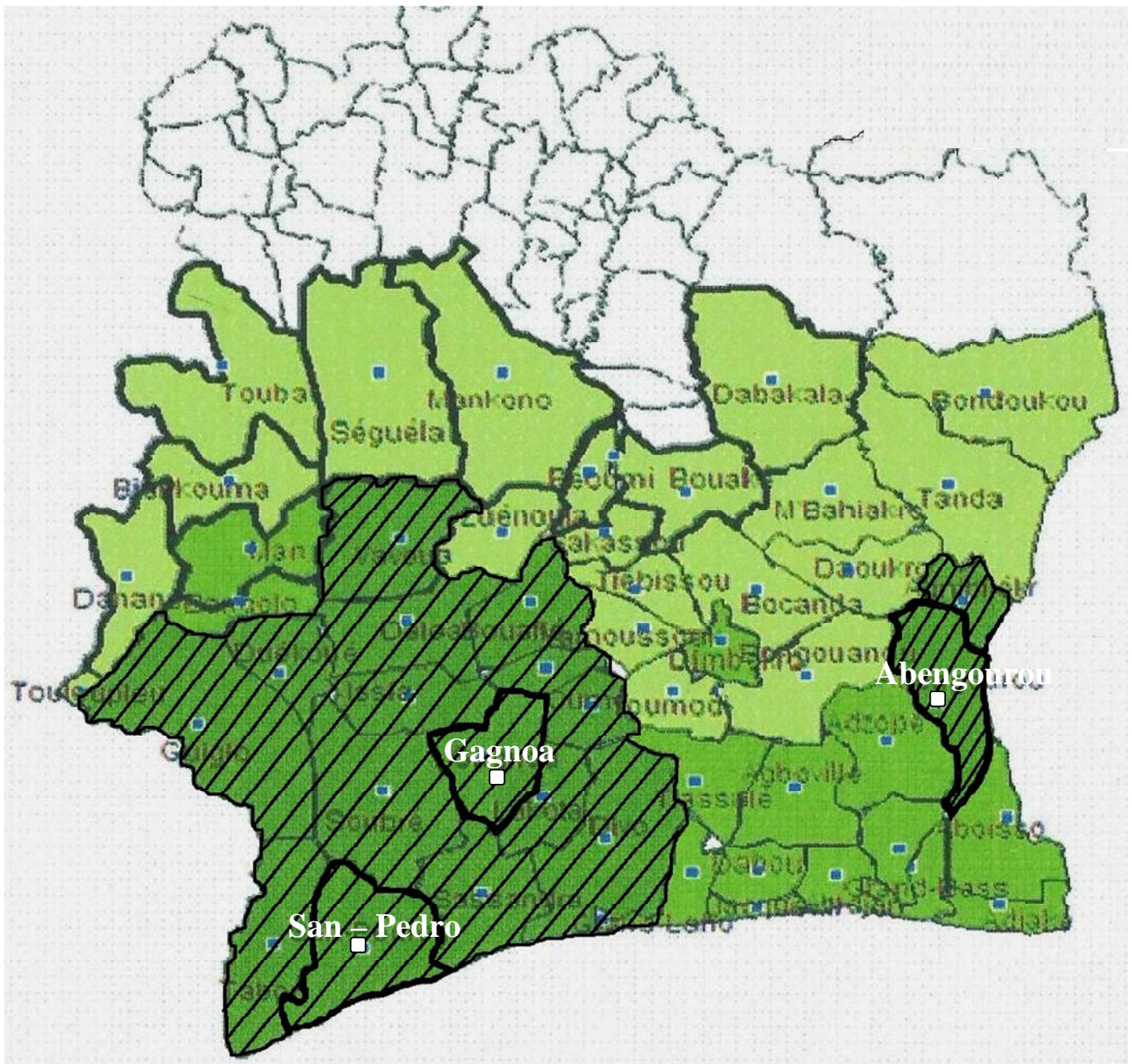
I -2 –Méthodologie

Le protocole d'échantillonnage a été établi par le CNRA (Centre National de Recherche Agronomique)

I - 2 - 1 - Lieux de collectes

La collecte s'est déroulée conjointement dans trois régions de la Côte d'Ivoire représentant les trois principales zones de production de cacao du pays (figure 8)

- ✓ Zone du Sud-ouest ; à Gabiadji (San-Pedro)
- ✓ Zone du Centre-Ouest ; à Téhiri (Gagnoa)
- ✓ Zone de l'Est ; à Yakassé-Féyassé (Abengourou)



Catégorisation des zones régions productrices de cacao en Côte d'Ivoire, juin 2006 ;




-  87 % de la production nationale de cacao
-  11 % de la production nationale de cacao
-  2 % de la production nationale de cacao

Figure 8: Principales zones de production du cacao (hachurées en noir). Les zones de collecte des échantillons Abengourou, Gagnoa et San Pedro

I - 2 - 2 - Récolte

Pour chaque essai, les cabosses de cacao mûres récoltées sont triées et classées en fonction de leur état sanitaire :

La cabosse intacte (figure 9) : c'est la cabosse à maturité (couleur jaune ou orangée) et qui ne présente pas de défaut au niveau du cortex extérieur (lésions, attaque d'insectes) et à l'ouverture de la cabosse aucune tache colorée, ni de moisissures n'ont été observé sur les fèves.

La cabosse piquée (figure 10) : cabosse mûre présentant uniquement des lésions causées par les insectes au niveau du cortex extérieur.

La cabosse pourrie (figure 11) : cabosse mature présentant des traces de pourriture brune et autre source de pourritures uniquement au niveau du cortex extérieur.

La cabosse blessée (figure 12) : cabosse mature présentant uniquement au niveau du cortex extérieur des traces de lésions dues à la machette, aux faucilles ou autres au moment de la récolte.

Un mélange de ces différents types de cabosses est réalisé de façon à obtenir cinq tas de 500 cabosses chacun :

Tas1 : 500 cabosses intactes

Tas 2: 250 cabosses intactes + 250cabosses piquées

Tas 3 : 250cabosses intactes + 250 cabosses pourries

Tas4 : 250 cabosses intactes + 250 cabosses blessées

Tas5 : 500 cabosses non triées (tas tout venant ou tas paysan).

La cueillette est faite à la machette ou avec une perche surmontée d'un outil métallique en forme de faucille pour les cabosses inaccessibles à la main.



Figure9 :(a) Cabosse de cacao intacte ; (b) Cabosse intacte à l'ouverture



Figure 10 : (c) Cabosses de cacao piquées par les insectes ; (d) Cabosse piquée à l'ouverture

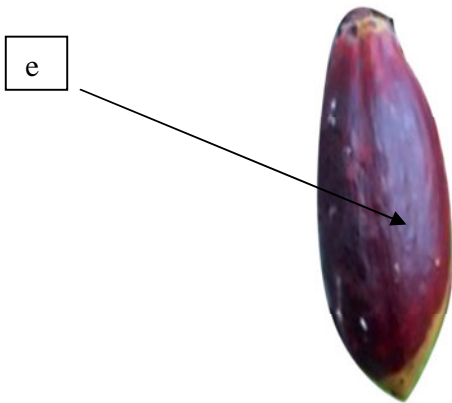


Figure 11 : (e) Cabosse de cacao pourrie ; (f) Cabosse pourrie à l'ouverture

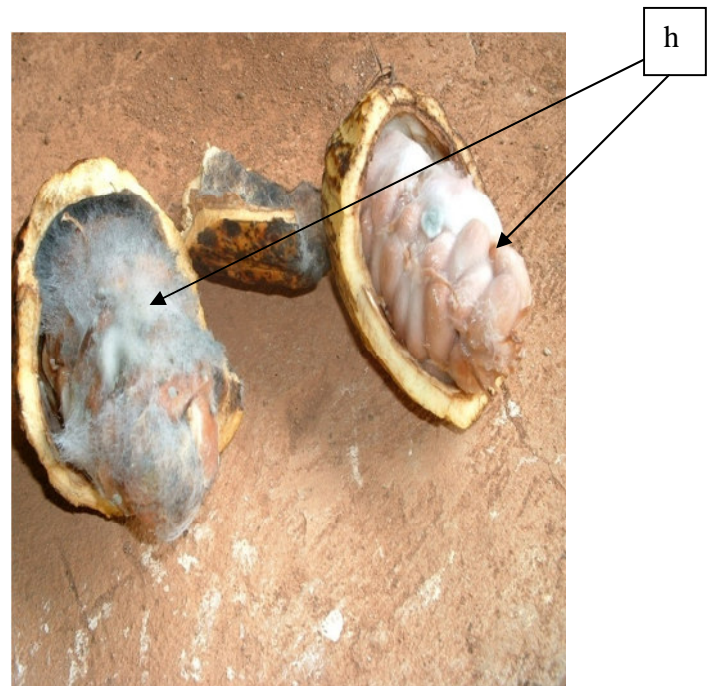


Figure 12 : (g) Cabosse de cacao blessée ; (h) Cabosses blessées à l'ouverture

I - 2 - 3 - Ecabossage

Les cabosses de cacao sont assemblées pendant une semaine, les cabosses de chaque tas sont ouvertes à l'aide de gourdin et les fèves extraites manuellement figures n°9, 10, 11, 12 et 17. Un échantillon de 4 kg de fèves fraîches de chaque tas est prélevé et conservé à -22 °C.



Figure 13 : Ecabossage des cabosses de cacao

I - 2 - 4 - Fermentation

La fermentation débute dès la fin de l'écabossage. Elle consiste à placer les fèves de chaque lot sous des feuilles de bananier de manière à les isoler du milieu extérieur (figure14). On note une élévation de la température à l'intérieur de ce support. Cette étape permet de débarrasser les fèves de la pulpe mucilagineuse qui les entoure et d'éviter leur germination. Elle dure quatre (04) jours. Un échantillon de 4 kg de fèves fermentées est prélevé de chaque lot et conservé à -22 °C.



Figure 14 : (i) Fèves de cacao en fermentation sous feuilles de bananier

(j) Fèves de cacao fermentées

I - 2 - 5 - Séchage

Il a pour but de ramener la teneur en humidité des fèves à 6 - 7 %. La méthode de séchage au soleil est utilisée. Les fèves sont étalées sur des bâches noires figure 15. A la fin du séchage un échantillon de 4 kg de fèves séchées est prélevé de chaque lot et conservé à -22 °C.



Figure 15 : Fèves de cacao (k) en séchage sur du papier polyane (bâche noire) (l)

I - 2 - 6 - Séchage des échantillons frais au laboratoire

Les échantillons frais, préalablement conservés en chambre froide, sont séchés à l'étuve à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une humidité relative inférieure à 8 %.

I - 2 - 7 - Broyage

Les fèves séchées au soleil ou séchées à l'étuve, préalablement conservées à -22 °C sont broyées dans un Moulinex (Waring Blender) pour obtenir des poudres fines qui sont ensuite homogénéisées. 200 g de poudre de chaque échantillon sont ensuite prélevés dans des sachets et conservés en chambre froide à -22°C jusqu'à l'analyse.

II- DOSAGE DE L'OTA

II -1 -Matériels

- Verreries et accessoires :
 - Verrerie (erlenmeyer, bécher, ballon à fond plat, éprouvette graduée)
 - Tube à essai en verre avec capuchon stérilisable
 - Entonnoir, portoir, pipette, pissette
 - Flacons en verre pour le recueil des échantillons après extraction
 - Flacons (bouteilles) pour les solutions expérimentales
 - Seringue en plastique de 10 ml
 - Adaptateur en plastique
 - Réservoir en verre
 - Micropipette
 - Embouts
 - Sachets de conditionnement
 - spatule
 - Fiole jaugé en verre claire (100ml, 250ml, 500ml, 1000 ml)
- Appareillage
 - Agitateur magnétique avec plaque chauffante type TMA (Karl Hecht KG)
 - Etuve (Binder)
 - Réfrigérateur (Xper BD-108)
 - Dispositif de filtration de type Büchner
 - Agitateur vibrant ou vortex type VM3 (Karl Hecht KG)
 - Moulinex (Waring Blender)
 - Balance de précision (Shimadzu)
 - Système HPLC (Shimadzu) figure 16 composé de :
 - ✓ un réservoir de phase mobile (bouteille d'une capacité de 1 litre)
 - ✓ un dégazeur (Shimadzu degazer) modèle DGU 14A

- ✓ une pompe (Shimadzu liquide chromatographique) modèle LC-10Adpv
- ✓ un système automatique d'injection des échantillons (Shimadzu)
- ✓ un détecteur à fluorescence (Shimadzu fluorescence detector)
modèle RF-10AXL
- ✓ un système contrôleur (Shimadzu CBM-20A).
- ✓ L'ensemble du système est piloté par le logiciel Lab Solution (Shimadzu)



Figure 16 : Système HPLC

➤ Consommables

- Papier filtre Whatman n°4
- Colonne analytique (phase inverse) type : Spherisorb C₁₈S₅ ODS 2,5 µm (250 mm x 4,6 mm) avec précolonne
- Colonne d'immuno affinité (ochraprep) type :(R-Biopharm)

➤ Réactifs et Préparations

- Solution d'hydrogénocarbonate de sodium à 3% (m/v) (Scharlau)

30 g d'hydrogénocarbonate de sodium sont pesés et placés dans une fiole jaugée à 1 litre. On y ajoute de l'eau déminéralisée jusqu'au trait de jauge puis on mélange à l'aide d'un agitateur magnétique.

- Méthanol pur pour analyse (Merck)
- Mélange méthanol / hydrogénocarbonate de sodium 3% (50/50)

Mettre 500 ml de méthanol quantité HPLC (Merck) dans une fiole jaugée de 1 litre et complétés avec 500 ml d'hydrogénocarbonate de sodium à 3% 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 qualité HPLC / eau qualité HPLC / acide acétique(Merck) (55/43/2) (V/V/V)

Pour 1000 ml de phase mobile, sont prélevés :

- 550 ml d'acétonitrile
- 430 ml d'eau déminéralisée (qualité HPLC)
- 20 ml d'acide acétique(Merck) soit 2 %

L'ensemble est mélangé à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtré et dégazé à l'aide d'une pompe à vide.

- Mélange méthanol /acide acétique (Merck) (98/2) (V/V)

Pour 100ml, 98 ml de méthanol et 2 ml d'acide acétique (Merck). Mélanger à l'aide de l'agitateur magnétique.

- Hypochlorite de sodium (Merck)

- Produit de référence

- Poudre d'Ochratoxine A(R-Biopharm)

- Préparation de la solution standard

- Solution-mère d'OTA à 20970 $\mu\text{g/l}$

- Elle est obtenue par dissolution de la poudre d'OTA dans le mélange toluène/acide acétique (99/1).Après lecture au spectrophotomètre UV/VIS, nous obtenons une absorbance A qui est de 0,2831.L'absorbance permet de déterminer la concentration C_M de la solution mère qui est égale à 20970 $\mu\text{g/l}$.Cette solution est conservée dans une fiole ambrée en chambre froide négative.

- Solution intermédiaire

- Elle est obtenue à partir de la dilution de la solution mère au 1/100^{ème}.

- 1 ml de la solution mère est mis à évaporer à sec dans un bêcher et le résidu est repris dans 100ml du mélange méthanol/acide acétique/tampon phosphate (50/1/49).La concentration obtenue est alors de 209,7 $\mu\text{g/l}$.Cette solution est également conservée dans une fiole ambrée au réfrigérateur.

- Solution de travail

- 1 ml de la solution intermédiaire est dilué dans 20 ml du mélange méthanol/acide acétique/tampon PBS (50/1/49).La nouvelle solution obtenue a une concentration de 10.485 $\mu\text{g/l}$ et constitue notre solution de travail.

- Gamme étalon

On prépare 7 standards de la solution de travail dans les proportions décrites par le tableau X. Le volume total de chaque étalon est de 10 000 μl .

Tableau X : gamme étalon

Standard	Volume de la solution de travail à prélever (µl)	Mélange Méthanol/Acide acétique/ PBS (µl)	Concentration en OTA de la solution standard (µg/l)
1	17,16	9983,84	0,018
2	28,61	9971,39	0,03
3	85,83	9914,17	0,09
4	429,18	9570,82	0,45
5	1717,73	8283,27	1,8
6	4292,84	5708,16	4,5
7	8584,69	1416,31	9

II - 2 - Méthode de dosage de l'OTA

Tous les échantillons ont été conservés en chambre froide négative à 22°C avant le début des analyses.

II-2-1.Extraction de l'OTA

15 g de poudre de cacao sont pesés à l'aide d'une balance de précision et dilués dans 150 ml du mélange méthanol/hydrogénocarbonate de sodium à 3 %. Le mélange obtenu est agité à 1300 tours/min pendant 15 min à l'aide d'un agitateur magnétique puis filtré à l'aide d'un papier filtre Whatman n°4. 11 ml du filtrat obtenu sont dilués dans 11 ml de tampon PBS et mélangé au vortex. On obtient ainsi 22 ml d'extrait.

II-2-2.Purification sur colonne d'immuno affinité

La colonne d'immuno affinité utilisée est l'Ochraprep.Elle contient une suspension en gel d'anticorps monoclonaux fixés par covalence à un support solide. Les colonnes d'immuno affinité sont sorties de la chambre froide positive au moins 30 min avant de commencer le test et laissées à la température ambiante. Les colonnes sont vidées de leur liquide de conservation et conditionnées avec 10 ml de solution PBS à un débit de 3 ml/min (ne pas sécher la colonne) car le tampon PBS assure la protection des anticorps et donc permet d'éviter leur dégradation par des substances fortes comme les solvants d'extraction.20 ml d'échantillon prélevés à l'aide d'une pipette sont déposés sur la colonne à un débit de 2 ml/min grâce à la pompe à vide. L'OTA est aussitôt capturée par les anticorps de la suspension gélosée. La colonne est lavée avec 10 ml de BPS à un débit de 3 ml/min afin d'éliminer les composants étrangers. On procède ensuite à une élution de l'OTA par 1,5 ml du mélange Méthanol/Acide acétique en trois étapes de 0,5 ml avec une pause de 1 min entre chaque étape, à un débit de 0,5 ml/min. Puis les colonnes sont lavées par 1,5 ml de PBS sur la colonne à un débit de 0,5 ml/min. Le volume final de l'éluât est 2,8 ml et non 3 ml car il reste toujours quelques gouttelettes sur la colonne.

II-2-3.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 composé de la phase stationnaire et de la phase mobile où l'échantillon s'équilibre un grand nombre de fois. La méthode de chromatographie HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie de partage en phase inverse.la phase stationnaire utilisée est constituée de groupement C₁₈greffé sur un support de silice.

➤ Conditions analytiques de la chromatographie HPLC

- La phase stationnaire est une colonne HPLC, phase inverse Spherisorb C₁₈ S₅ ODS2, 5µm (250 mm x 4,6 mm).
- La phase mobile est constituée d'un mélange acétonitrile /eau qualité HPLC / acide acétique (55/43/2) en régime isocratique.
- Le débit est de 1 ml/min
- détection fluorescente : Longueur d'excitation = 333 nm
Longueur d'émission = 460 nm.
- Le volume d'injection est de 100 µl.
- Le temps de rétention est d'environ 8 à 9 minutes.

➤ Expression des résultats

L'identification de l'OTA présent dans les échantillons de cacao s'est effectuée à temps de rétention variant entre 8 et 9 minutes

- Le calcul de la concentration en OTA est fait selon la méthode suivante :

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

C : concentration en matière active recherchée en µg/kg ou µg/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 µg/kg dans la solution étalon

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

m : masse d'échantillon analysé (15g)

v : volume d'échantillon analysé (10 ml)

V_{ext} : volume de solvant à l'extraction (150 ml)

V_a : volume d'aliquote prélevé après extraction (11 ml)

V₁ : volume d'échantillon dilué pour la purification (22 ml)

V₂ : volume d'échantillon dilué réellement purifié sur la cartouche (20 ml)

- Calcul de la moyenne de concentration (X)

$$X = \frac{\sum X_i}{N}$$

\sum = somme

X_i = concentration des échantillons

N = nombre d'échantillons

- Analyse statistique

Le logiciel STATA 11a servi à l'analyse statistique des données. La signification du test est déterminée en comparant la probabilité (P) associée à la statistique du test au seuil théorique $\alpha = 0,05$. Lorsque $P < 0,05$, on dit qu'il y a une différence significative ; dans le cas contraire ($P \geq 0,05$) la différence n'est pas significative.

II-2-4. Validation de la méthode de dosage de l'ochratoxine A

La méthode de dosage de l'OTA dans les échantillons de fèves de cacao a été validée selon la norme CE 401 /2006 du 23/02/2006. Les critères de validation sont la linéarité, la répétabilité, la justesse, exactitude, la limite de détection et la limite de quantification.

➤ Linéarité

C'est la capacité de la méthode à fournir, à l'intérieur d'un intervalle donné, des résultats directement proportionnels à la concentration (ou quantité) en substance à examiner (Caporal, 1990).

L'étude de la linéarité a été faite sur la gamme étalon obtenue par dilution successive de la solution-mère d'OTA à 20970 µg/l. Au total, 7 dilutions ont été réalisées : 0,018µg/l ; 0,03µg/l ; 0,09µg/l ; 0,45µg/l ; 1,8µg/l ; 4,5µg/l ; 9 µg/l.

A partir des résultats obtenus sont déterminés le coefficient de linéarité r , le coefficient de détermination r^2 , l'équation de la droite de régression. Ce qui a permis de définir le domaine de linéarité.

➤ Répétabilité

C'est l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans les mêmes conditions prescrites (Caporal, 1990). Elle exprime la fidélité de la méthode dans les conditions suivantes : même laboratoire, même analyse, même équipement, mêmes réactifs et dans des conditions aussi stables que possibles sur un court intervalle de temps.

La répétabilité de la solution de référence a été étudiée à deux niveaux de concentrations (4,5 µg/l et 9 µg/l) et chaque concentration a été injectée 6 fois.

Pour cette étude, un extrait de cacao a été injecté 6 fois ($n = 6$). On obtient ainsi une moyenne de concentration.

Pour étudier la répétabilité de la procédure, six extraits ont été effectués à partir d'un même échantillon. Chaque extrait est injecté 3 fois pour donner une moyenne

de concentration en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Une moyenne générale est calculée à partir des concentrations moyennes obtenues pour chaque extrait injecté.

➤ **Justesse**

C'est l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée. Elle désigne l'écart entre la valeur mesurée et la valeur réelle.

La justesse a été étudiée sur un matériel de référence *FAPAS* café vert T1771 fourni au laboratoire.

➤ **Exactitude**

C'est l'étroitesse de l'accord entre une valeur exacte ou acceptée comme telle et la valeur (ou la moyenne des valeurs) obtenue en appliquant la procédure d'analyse un certain nombre de fois (Caporal, 1990).

Elle a été effectuée à partir de la méthode des ajouts dosés.

➤ **Limite de détection (LOD)**

Elle équivaut à la plus faible concentration de la substance à analyser détectable : c'est le seuil de détection (Caporal, 1990). Nous avons évalué le seuil de détection en effectuant différentes dilutions de la solution mère de référence et avons réalisé l'analyse chromatographique sur les dilutions successives de cette solution. La limite de détection est estimée par rapport au bruit de fonds (3x le bruit de fonds)

➤ **Limite de quantification (LOQ)**

Elle est déterminée par l'analyse d'échantillons contenant des concentrations connues de produits à analyser et par l'établissement du niveau minimal auquel on peut quantifier le produit à analyser avec une exactitude et une précision acceptable (Caporal, 1990). La limite de quantification est objectivée par un pic intégrable (temps de rétention, surface) sur le chromatogramme. la LOQ correspond à 5 x le bruit de fonds.

III – RESULTATS

III-1. Etude de la validation analytique

III-1-1. Linéarité de la méthode

La figure 17 présente la courbe d'étalonnage et les figures 18 et 19 les chromatogrammes de la solution de référence et d'un extrait d'échantillon de cacao.

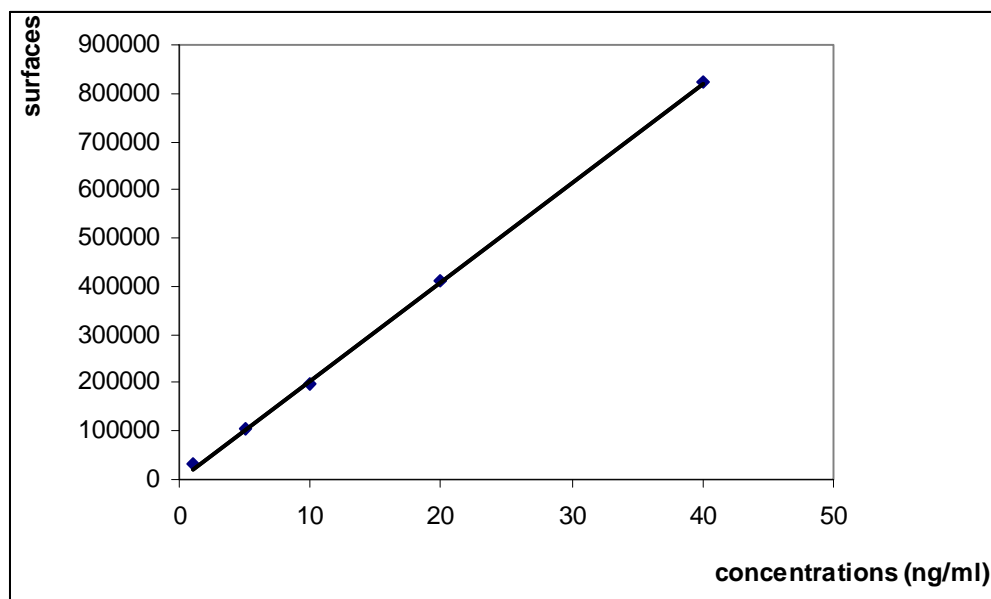


Figure 17 : courbe d'étalonnage avec une gamme de concentration de 0 à 40 ng/ml

Coefficient de détermination $r^2 = 0,9995$

Équation de la droite de régression $y = 20532x$

Le domaine de linéarité s'étend de 0 à 40 ng/ml. Le coefficient de détermination ($r^2 = 0,9995$) est proche de 1. Il existe donc une proportionnalité entre la surface du pic chromatographique et la concentration de l'OTA dans le domaine de linéarité de 0 à 40 ng/ml.

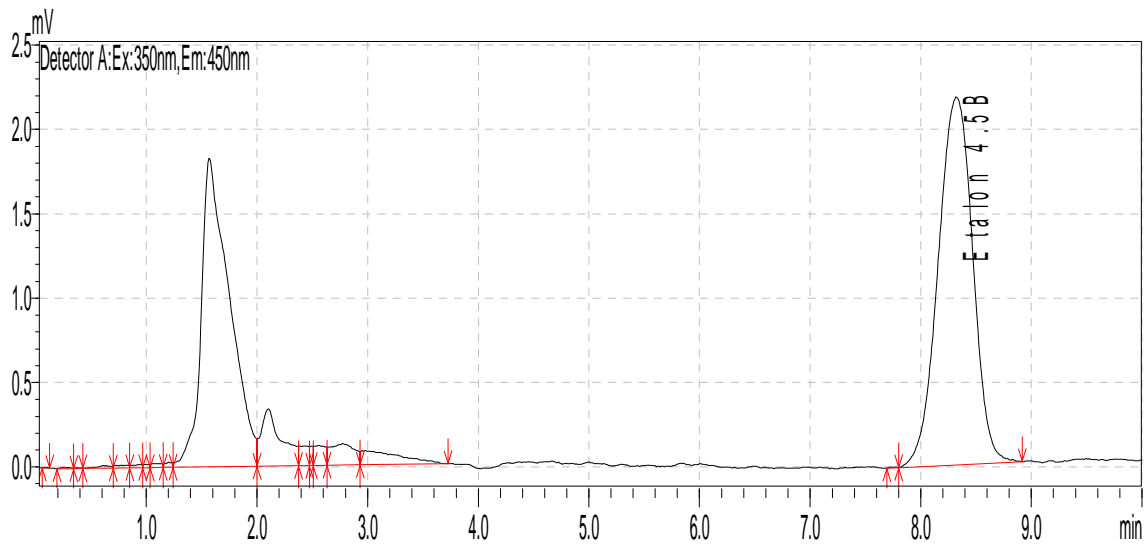


Figure 18 : chromatogramme d'une solution de référence (5 µg/l).
Le temps de rétention de l'OTA est de 8,45 minutes.

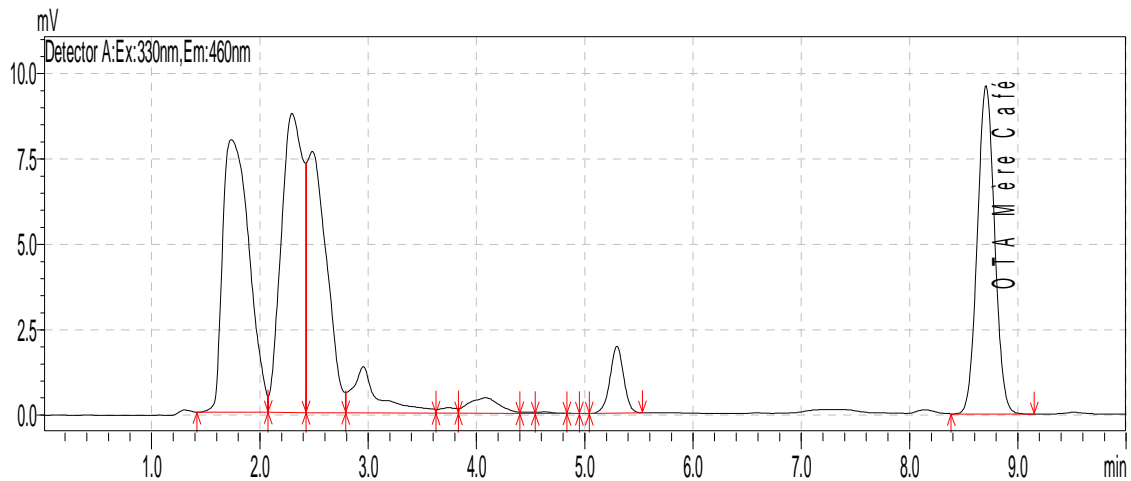


Figure 19 a : chromatogramme de l'échantillon de référence FAPAS café.

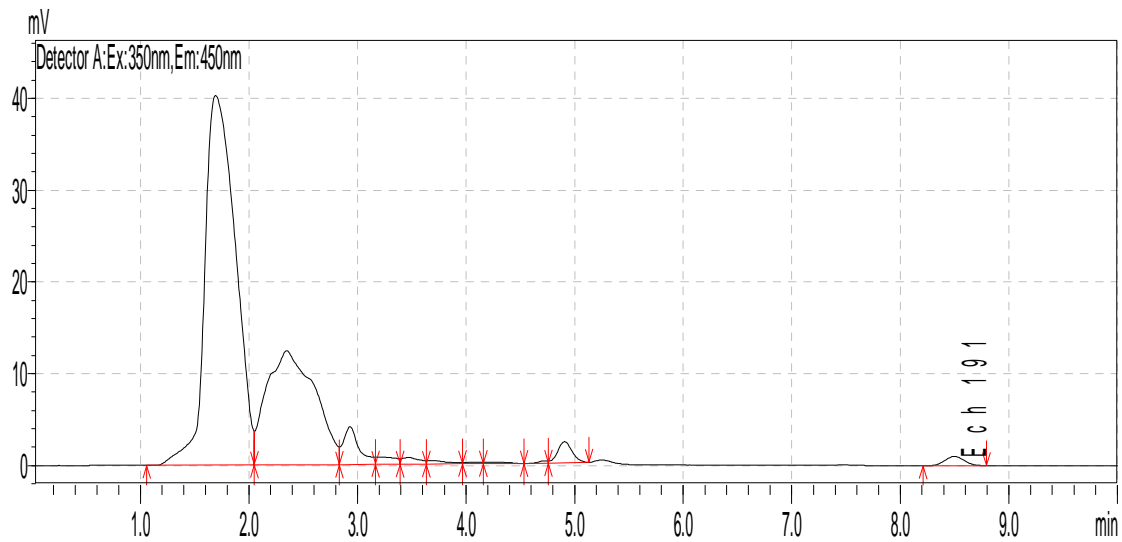


Figure 19 b : chromatogramme d'un extrait de cacao.

III-1-2. Répétabilité de la méthode

➤ Répétabilité des solutions de référence

Tableau XI : étude de la répétabilité des solutions de référence

Concentration en OTA ($\mu\text{g/l}$)	Surface	Moyenne des surfaces	Ecart-type	Coefficient de variation
4,5	200868 202053 200479 199191 198877 202382	200641	1436 ,43	0,71
9	527735 534260 524351 530595 527688	529340	3472	0,65

La répétabilité de la solution de référence a été étudiée à deux niveaux de concentrations (4,5 µg/l et 9 µg/l) et chaque concentration a été injectée 6 fois. Les coefficients de variations ainsi obtenus (respectivement 0,71 % et 0,65 %) sont inférieurs à 2 %, valeur admise en analyse quantitative des solutions de référence (Chaminade, 1995).

➤ Répétabilité des extraits de cacao

Tableau XII : étude de la répétabilité des extraits de cacao

Concentration en OTA (µg/kg)	Moyenne (µg/kg)	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
2,01 2,00 1,98 2,15 2,07 1,98	2,025	0,074	3,65

Un extrait de cacao a été injecté 6 fois (n = 6). On obtient ainsi une moyenne de concentration de 2,025 µg/kg. Le coefficient de variation de l'extrait de cacao obtenu (3,65 %) est inférieur à 5 %, valeur admise en analyse quantitative pour la répétabilité d'un extrait (Chaminade, 1995).

➤ *Répétabilité de la procédure sur un extrait de cacao*

Tableau XIII : étude de la répétabilité de la méthode sur un extrait de cacao

Concentration moyenne en OTA($\mu\text{g}/\text{kg}$) de chaque extrait	Moyenne ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ecart-type	Coefficient de variation (%)
10,25 9,54 9,21 10,11 10,00 9,67	9,7966	0,392	4

Six extraits sont effectués à partir d'un même échantillon. Chaque extrait est injecté 3 fois pour donner une moyenne de concentration en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Une moyenne générale est calculée à partir des concentrations moyennes obtenues pour chaque extrait injecté.

Le coefficient de variation des extraits de cacao ainsi obtenu est de 4 %. Il est donc inférieur à 5 %, valeur admise en analyse quantitative pour la répétabilité de la procédure sur un extrait (Chaminade, 1995).

III-1-3. Justesse de la méthode

Tableau XIV : résultats de l'étude de la justesse

	Résultats		Fourchette d'acceptabilité ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Laboratoire de Toxicologie ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Réf. FAPAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
Café vert T1771	7,27	7,67	4,29 – 11,04

La justesse a été étudiée sur un matériel de référence *FAPAS* café vert T1771 fourni au laboratoire.

La valeur obtenue (7,27 µg/kg) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité (4,29 – 11,04 µg/kg).

III-1-4.Exactitude de la méthode

Tableau XV : étude de l'exactitude de la méthode

Quantité ajouté (µg)	Concentration obtenue (µg/kg)	Pourcentage de récupération (%)	Erreur relative (%)	Pourcentage de récupération moyen (%)	Erreur relative moyenne (%)
25	2,413	96,52	3,48	95,82	- 4 ,18
	2,396	95,84	4,16		
	2,378	95,12	4,88		
50	4,836	96,72	3,28	94,78	- 5,22
	4,632	92,64	7,36		
	4,749	94,98	5,02		
Pourcentage de récupération moyen (%)				95,27	
Erreur relative moyenne (%)					- 4,7

Elle a été effectuée à partir de la méthode des ajouts dosés. Le pourcentage moyen de récupération obtenu (95,27) est compris entre 90 % et 110 %, intervalle de valeurs recommandées en analyse quantitative pour l'exactitude d'une méthode (Chaminade, 1995).

III-1-5.Limite de détection

La limite de détection de la méthode est de : 0,05 µg/kg.

III-1-6.Limite de quantification

La limite de quantification de la méthode est de : 0,2 µg/kg.

III-2. Résultats de la collecte des échantillons

La collecte des échantillons s'est déroulée dans les localités d'Abengourou, Gagnoa et San Pedro. "L'essai" qui comprend les opérations post-récoltes : (récolte, écabossage, fermentation et le séchage) a été réalisé 11 fois pour chaque état sanitaire (Abengourou, n=3, Gagnoa, n=4 San Pedro, n=4). Au total, 165 échantillons de fèves de cacao ont été prélevés dans les trois localités. La répartition des échantillons par état sanitaire de la cabosse de cacao et par opération post- récolte est consignée dans le tableau XVI

Tableau XVI : Nombre d'échantillons par type de cabosse et par stade de transformation post-récolte

types de Cabosse	opérations post- récolte			total
	ecabossage	fermentation	séchage	
cabosses intactes	11	11	11	33
cabosses piquées	11	11	11	33
cabosses pourries	11	11	11	33
cabosses blessées	11	11	11	33
cabosses tout venant	11	11	11	33
Total	55	55	55	165

III-3-Résultats de l'analyse quantitative des échantillons par HPLC

III-3-1-opération post-récolte : ecabossage

Les résultats du dosage en OTA des échantillons à l'ecabossage sont consignés dans le tableau ci- dessous.

Tableaux XVII : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à l'ecabossage à Abengourou

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	0,092	0,99	<LOD	2,03	0,08
2	0,2	0,06	0,11	<LOD	3,03
3	<LOD	0,06	1,25	<LOD	0,85

Tableaux XVIII : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à l'ecabossage à Gagnoa

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	<LOD	0,95	<LOD	1,48	1,49
2	0,55	0,22	0,31	0,21	0,59
3	0,19	0,52	0,2	<LOD	0,55
4	0,1	1,63	1,99	2,9	2,29

Tableaux XIX : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à l'ecabossage à San Pedro

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	<LOD	0,69	1,13	1,78	0,18
2	<LOD	0,05	0,26	1,25	1,41
3	0,34	<LOD	0,88	9,09	<LOD
4	nd	9,54	6,46	<LOD	4,2

Le dosage de l'OTA a été effectué dans 54 échantillons, 42 /54 soit 77.77% des échantillons analysés avaient une contamination de teneurs en OTA supérieure à la limite de détection LOD (0,05 µg/kg)

NB : nd correspond à non déterminé

III-3-2-opération post-récolte : fin de la fermentation

Les résultats du dosage en OTA des échantillons à la fin de la fermentation sont consignés dans le tableau ci- dessous.

Tableau XX : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à la fin fermentation à Abengourou

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	0,1	< LOD	1,07	1,98	0,48
2	< LOD	0,42	3,24	< LOD	2,43
3	< LOD	0,09	9,69	0,06	0,25

Tableau XXI : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à la fin fermentation à Gagnoa

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	0,15	0,08	2,14	< LOD	1,33
2	0,4	0,43	4,78	1,49	0,09
3	0,19	0,57	< LOD	1,12	2,45
4	< LOD	1,74	1,59	< LOD	1,91

Tableau XXII : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à la fin fermentation à San Pedro

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	0,17	3,01	0,08	1,56	0,77
2	0,07	0,06	< LOD	0,59	1,36
3	< LOD	1,77	4,31	1,71	2,44
4	0,1	2,36	2,52	1,2	1,58

Le dosage de l'OTA a été effectué dans 55 échantillons, 45/55 soit 81,81% des fèves fermentées avaient une contamination de teneurs en OTA supérieure à la limite de détection LOD (0,05 µg/kg).

III-3-3-opération post-récolte : fin du séchage

Les résultats du dosage en OTA des échantillons à la fin du séchage sont consignés dans le tableau ci- dessous.

Tableaux XXIII : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à fin du séchage à Abengourou

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	0,12	1,31	0,83	0,95	1
2	0,63	4,73	4,51	0,37	nd
3	0,07	0,97	0,45	3,3	1,48

Tableaux XXIV : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à fin du séchage à Gagnoa

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	< LOD	0,49	0,22	3,6	< LOD
2	< LOD	5,64	5,36	2,07	1,06
3	0,1	0,89	0,38	1,4	1,15
4	0,53	0,1	0,48	10,5	< LOD

Tableaux XXV : Taux d'OTA en µg/kg dans les différents échantillons à fin du séchage à San Pedro

Essai	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
1	0,08	0,29	< LOD	1,76	0,29
2	< LOD	0,94	0,24	0,69	2,46
3	0,23	2,55	0,46	0,84	0,92
4	< LOD	9,45	6,46	< LOD	4,2

Le dosage de l'OTA a été effectué dans 54 échantillons, 46/54 soit 85,18%.des fèves sèches analysées avaient une contamination de teneurs en OTA supérieure à la limite de détection LOD (0,05 µg/kg).

III-4-Taux moyen de contamination en OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dans les différents échantillons par état sanitaire et par stade de transformation

III- 4-1. Etape de l'écabossage

Tableau XXVI : Taux moyen d'OTA en $\mu\text{g}/\text{kg}$ par type de cabosses à l'écabossage

Etats sanitaires des cabosses				
cabosses Intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
$0,15 \pm 0,12^a$	$0,75 \pm 0,61^{a,b}$	$0,84 \pm 0,64^{a,b}$	$1,16 \pm 0,79^{a,b}$	$1,23 \pm 0,75^b$

Les moyennes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes au risque 5%.

Les taux moyens de OTA des cabosses intactes ($0,15 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{kg}$) et des cabosses tout venant ($1,23 \pm 0,75 \mu\text{g}/\text{kg}$) diffèrent significativement au risque 5%.

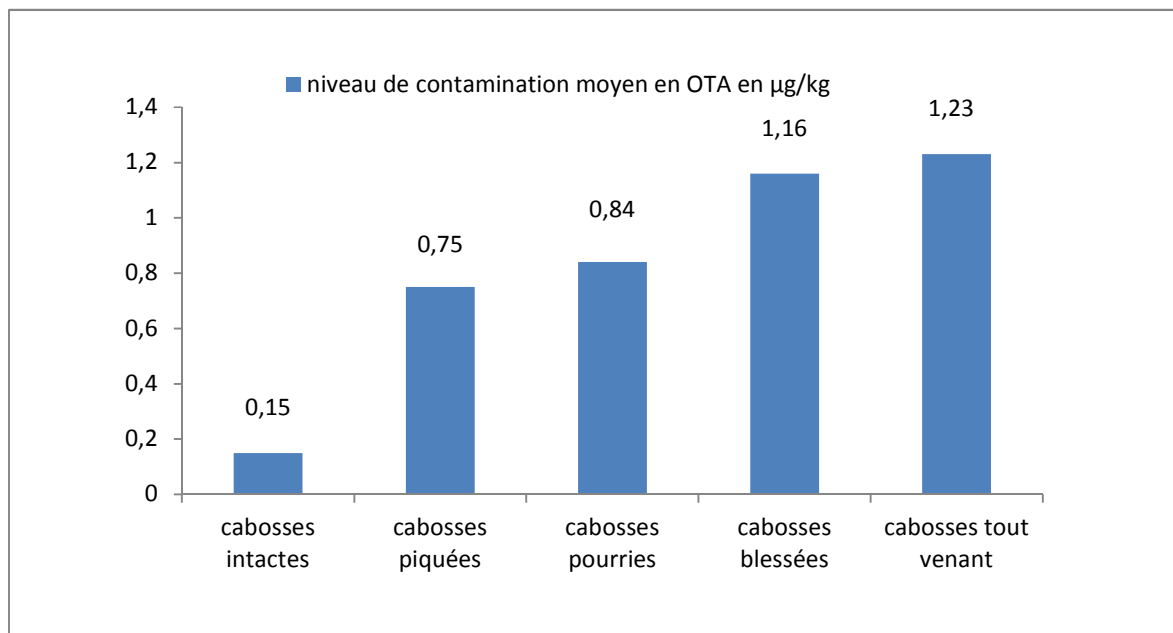


Figure 20 : Niveau moyen de contamination en OTA par type de cabosses à l'écabossage

III-4-2. Etape de la fin fermentation

Tableau XXVII : Taux moyen d'OTA en $\mu\text{g}/\text{kg}$ par type de cabosses à la fin de la Fermentation

Etats sanitaires des cabosses				
cabosses Intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
$0,11 \pm 0,07^c$	$0,96 \pm 0,71^d$	$1,78 \pm 0,86^d$	$0,89 \pm 0,51^{c,d}$	$1,37 \pm 0,59^d$

Les moyennes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes au risque 5%

Le taux moyen d'OTA est faible dans les fèves des cabosses intactes ($0,11 \pm 0,07\mu\text{g}/\text{kg}$) et diffère significativement des taux d'OTA dans les cabosses piquées ($0,96 \pm 0,71\mu\text{g}/\text{kg}$), des cabosses pourries ($1,78 \pm 0,86\mu\text{g}/\text{kg}$) et des cabosses tout venant ($1,37 \pm 0,59\mu\text{g}/\text{kg}$) au risque 5%.

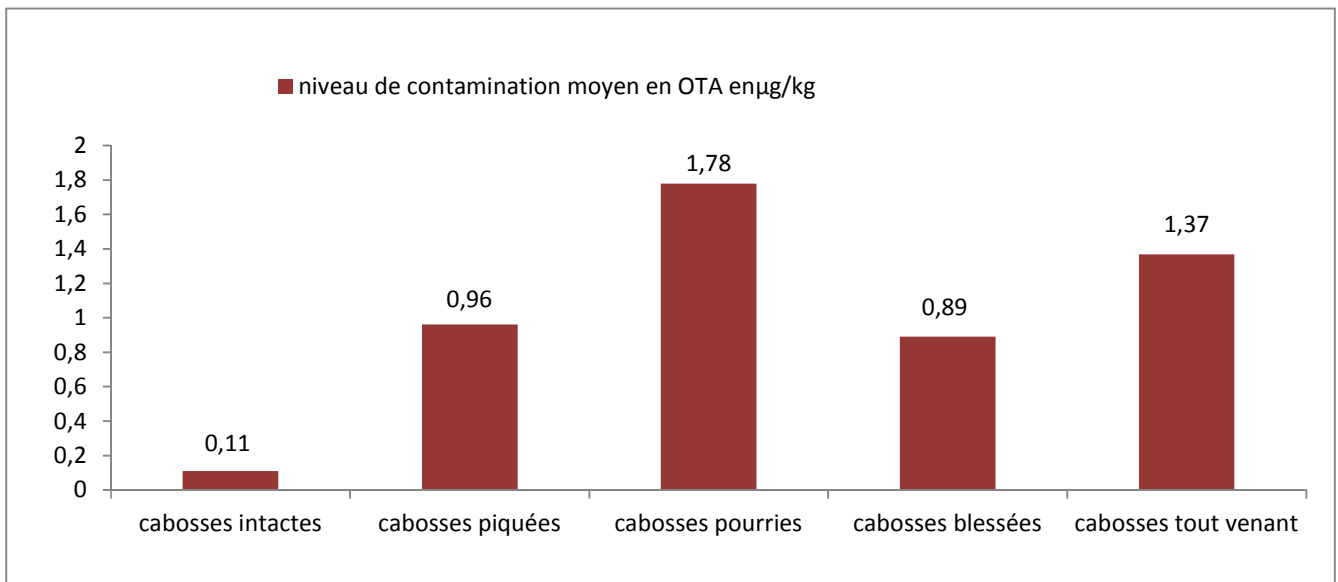


Figure 21 : Niveau moyen de contamination en OTA par type de cabosses à la fin de la fermentation

III-4-3. Etape de la fin du séchage

Tableau XXVIII : Taux moyen d'OTA $\mu\text{g}/\text{kg}$ par types de cabosses à la fin du séchage

Etats sanitaires des cabosses				
cabosses Intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
$0,16 \pm 0,14^e$	$1,51 \pm 0,78^f$	$1,10 \pm 0,84^f$	$1,56 \pm 0,74^f$	$1,15 \pm 0,70^f$

Les moyennes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes au risque 5%

Le taux moyen d'OTA est faible dans les fèves des cabosses intactes ($0,16 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{kg}$) et diffère significativement au risque 5% de ceux des taux moyens d'OTA dans les cabosses blessées ($1,56 \pm 0,74 \mu\text{g}/\text{kg}$), les cabosses piquées ($1,51 \pm 0,78 \mu\text{g}/\text{kg}$), les cabosses tout venant ($1,15 \pm 0,70 \mu\text{g}/\text{kg}$) et les cabosses pourries ($1,10 \pm 0,84 \mu\text{g}/\text{kg}$).

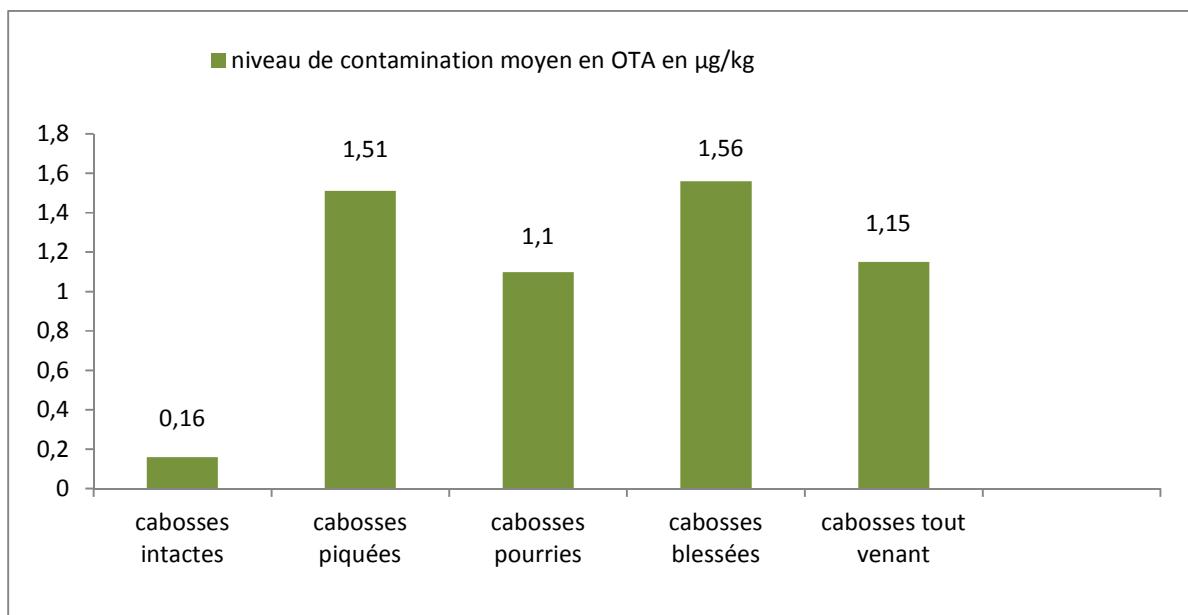


Figure 22 : Niveau moyen de contamination en OTA par type de cabosses à la fin du séchage

III-4-4. Synthèse des différents taux moyen d'OTA en $\mu\text{g}/\text{kg}$ par état sanitaire de la cabosse de cacao en fonction des opérations post- récolte

Tableau XXIX : Tableau de synthèse des différents taux moyen d’OTA en µg/kg par état sanitaire de la cabosse de cacao en fonction des opérations post- récolte

Stade de transformation	Etats sanitaires de la cabosse de cacao				
	cabosses intactes	cabosses piquées	cabosses pourries	cabosses blessées	cabosses tout venant
Ecabossage	0,15±0,12 ^a	0,75±0,61 ^{a, b}	0,84±0,64 ^{a, b}	1,16±0,79 ^{a, b}	1,23±0,75 ^b
Fermentation	0,11±0,07 ^c	0,96±0,71 ^d	1,78±0,86 ^d	0,89±0,51 ^{c, d}	1,37±0,59 ^d
Séchage	0,16±0,14 ^e	1,51±0,78 ^f	1,10±0,84 ^f	1,56±0,74 ^f	1,15±0,70 ^f

Les moyennes portant la même lettre dans la même ligne ne sont pas significativement différentes au risque 5%.

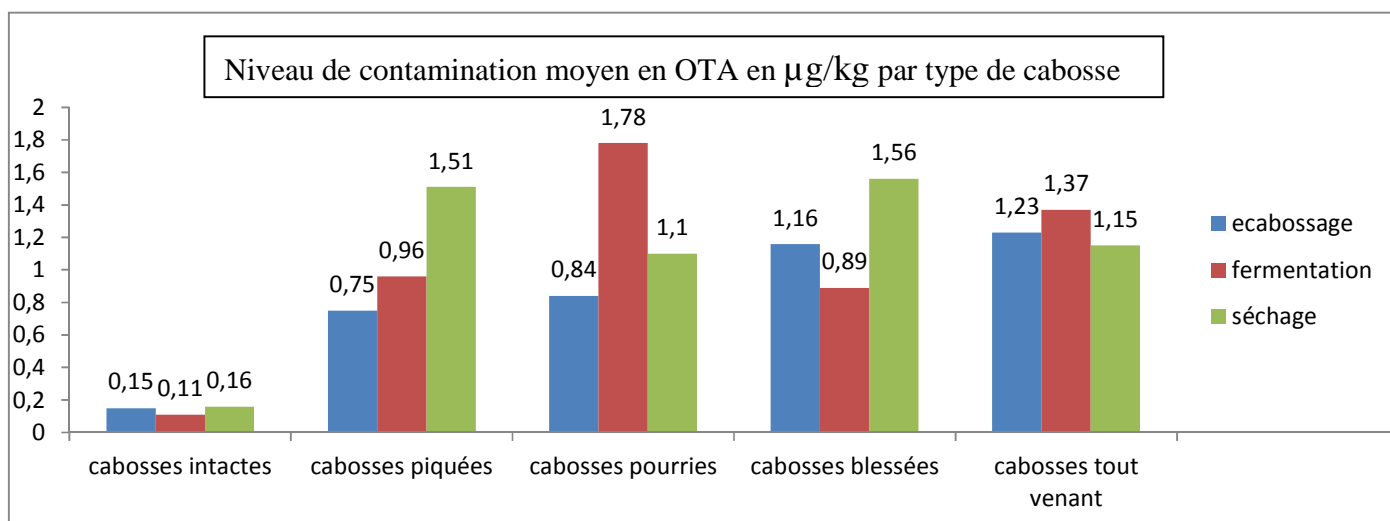


Figure 23 : Niveau de contamination par état sanitaire de la cabosse de cacao aux différents stades de transformation post récolte.

Quel que soit le stade de transformation, les taux d’OTA les plus faibles sont rencontrés dans les fèves de cabosses intactes (0,11± 0,07 à 0,16± 0,14 µg/kg)

IV –DISCUSSIONS

IV-1. Validation de la méthode analytique

Les échantillons ont été analysés par HPLC et soumis à des tests statistiques. L'étude de la linéarité montre que le coefficient de corrélation et le coefficient de détermination sont très proches de 1. Aussi, le domaine de linéarité s'étend de 0,018 à 9 µg/l.

Les coefficients de variations (respectivement 0,71 % et 0,65 % pour des concentrations de 4,5 µg/l et de 9 µg/l) sont inférieurs à 2 %, valeur admise en analyse quantitative des solutions de référence. Le coefficient de variation des extraits de cacao (3,65 %) est inférieur à 5 %, valeur maximale admise en analyse quantitative pour la répétabilité d'un extrait.

La justesse a été étudiée sur un matériel de référence FAPAS café vert T1771 fourni au laboratoire. La valeur obtenue (7,27 µg/kg) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité (4,29 – 11,04 µg/kg).

Le pourcentage moyen de récupération obtenu (95,27) est compris entre 90 % et 110 %, intervalle de valeurs recommandées en analyse quantitative pour l'exactitude d'une méthode.

La limite de détection de la méthode est de 0,05 µg/kg et la limite de quantification de la méthode est de 0,2 µg/kg.

La méthode appliquée au dosage d'OTA dans les échantillons de fèves de cacao est conforme au règlement CE 401/2006 du 23/02/2006.

IV-2. Collecte des échantillons

L'étude a été réalisée conjointement dans trois (03) différentes localités. Ces localités représentent les trois principales zones de production du cacao en Côte d'Ivoire : Abengourou (l'Est), Gagnoa (le Centre-ouest), San-Pedro (le Sud-ouest). Les travaux de collectes des échantillons ont été effectués dans les mêmes conditions techniques. Dans les champs de cacao, nous avons trouvé quatre types de cabosses de cacao à savoir : les cabosses intactes, les cabosses blessées, les cabosses pourries et les cabosses piquées qui ont été l'objet de notre étude.

L'essai qui comprend les opérations post-récoltes : (récolte, écabossage, fermentation et le séchage) a été réalisé 11 fois pour chaque état sanitaire (Abengourou, n=3, Gagnoa, n=4 San Pedro, n=4). Au total, 165 échantillons de fèves de cacao ont été prélevés dans les trois localités. La répartition des échantillons par état sanitaire de la cabosse de cacao et par opération post-récolte est consignée dans le tableau XVI.

IV-3. Niveau de contamination des fèves de cacao

L'OTA a été déterminée à tous les stades de transformation post- récolte (écabossage, fermentation et séchage) et cela quel que soit l'état sanitaire de la cabosse (intacte,piquée,blessée et pourrie).La contamination en OTA se fait au champ et concerne toutes les qualités de cabosses de cacao.

Les taux moyens d'OTA en fonction de l'état sanitaire et des opérations post-récoltes sont résumés et consignés dans le tableau XXIX.Les taux moyens d'OTA varient de $0,11 \pm 0,07 \mu\text{g/kg}$ (cabosse intacte, fermentation) à $1,78 \pm 0,86 \mu\text{g/kg}$ (cabosse pourrie, fermentation).

De façon générale ,les teneurs en OTA les plus faibles sont observées au niveau du tas de cabosses intactes quel que soit le stade de transformation post- récolte: écabossage ($0,15 \pm 0,12 \mu\text{g/kg}$), fermentation ($0,11 \pm 0,07\mu\text{g/kg}$) et séchage

($0,16 \pm 0,14 \mu\text{g/kg}$). Pour le tas de cabosses piquées, les taux moyens d'OTA sont dans l'ordre croissant de l'écabossage ($0,75 \pm 0,61 \mu\text{g/kg}$) au séchage ($1,51 \pm 0,78 \mu\text{g/kg}$). Quant aux autres types de cabosses, les teneurs sont disparates.

Au stade de fin séchage, l'on remarque une différence significative entre le taux moyen d'OTA dans le tas de cabosses intactes ($0,16 \pm 0,14 \mu\text{g/kg}$) et ceux des autres états sanitaires de cabosses de cacao (pourries, piquées, blessées,) où les taux moyens d'OTA sont dans l'ordre suivants :

- $1,10 \pm 0,84 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses pourries
- $1,51 \pm 0,78 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses piquées
- $1,56 \pm 0,74 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses blessées

Nos résultats montrent que l'OTA provient essentiellement des cabosses endommagées : cabosses pourries, des cabosses blessées et des cabosses piquées. Nos résultats corroborent ceux de (Bastide, 2006 ; Dembélé, 2007 ; Mounjouenpou, 2011). Ces auteurs ont montré que les teneurs en OTA dépendaient du type de dommage subi par la cabosse. D'après (Bastide, 2006) les teneurs en OTA variaient selon la saison cacaoyère et dépendaient également du type de dommage subi par les cabosses. Ainsi, la teneur moyenne en OTA par rapport à la condition phytosanitaire des cabosses était répartie comme suit : saines ($2,3\mu\text{g/kg}$), endommagées par les insectes ($4,2\mu\text{g/kg}$), mutilées ($19,8\mu\text{g/kg}$), pourries ($7,2\mu\text{g/kg}$) et momifiées ($3,4\mu\text{g/kg}$).

Les teneurs en OTA à la fin du séchage sont d'un grand intérêt car provenant de fèves de cacao destinées à la commercialisation. Ainsi à la fin du séchage, les taux d'OTA quantifiés varient de $0,57$ (fèves sèches tout venant à Gagnoa) à $1,68 \mu\text{g/kg}$ (fèves sèches tout venant à San Pedro) en passant par Abengourou $1,24 \mu\text{g/kg}$. Le taux moyen de contamination dans ces trois localités était de $1,15 \mu\text{g/kg}$. Nos résultats sont proches de ceux de (Adama, 2013). Ces auteurs, après analyse de 1895 échantillons de fèves de cacao collectés dans les ports et les zones de production de cacao en Côte d'Ivoire ont rapporté les taux de contamination en

OTA variant de : $0,19 \pm 0,16$ à $1,90 \pm 1,87$ $\mu\text{g}/\text{kg}$ avec un taux moyen de $1,40 \pm 1,32$ $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Nos résultats démontrent que la contamination des fèves de cacao par l'OTA est due en grande partie aux conditions phytosanitaires des cabosses. Produire un cacao contenant une faible teneur en OTA revient pour le planteur de trier sa récolte et de jeter les cabosses blessées, les cabosses piquées et les pourries. Par conséquent, la sensibilisation pour le respect de l'application des bonnes pratiques agricoles constitue pour le planteur la mesure appropriée pour réduire le taux d'OTA dans le cacao.

CONCLUSION

L'Ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par des espèces de *Penicillium*, principalement *Penicillium verrucosum*, et de nombreuses espèces d'*Aspergillus* dont la plus connue et la plus toxigène est *Aspergillus ochraceus*. Elle peut être retrouvée dans une grande variété de denrées alimentaires destinées à l'homme et aux animaux. Ce sont notamment les céréales, les oléagineux, les fruits et légumes secs, le café, le cacao, les abats etc.

L'OTA possède des propriétés néphrotoxiques, immunosuppressives, tératogènes, génotoxiques et cancérigènes. Ce qui en fait un composé dangereux pour la santé humaine.

En Côte d'Ivoire, la nécessité de réduire l'impact de cette mycotoxine sur la qualité du cacao, et donc sur l'économie, a conduit à la mise en place du Programme de prévention et de contrôle de la contamination du café et du cacao par l'ochratoxine A, dénommé « Programme OTA ». C'est dans ce programme qu'est inscrite notre étude, qui a permis de rechercher et d'identifier les types de cabosses de cacao impliquées dans la contamination des fèves sèches de cacao dans le traitement post récolte. La contamination en OTA se fait au champ, elle concerne toutes les qualités de cabosses de cacao. La contamination en OTA est faible avec un taux moyen variant de $0,16 \pm 0,14 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses intactes, quant aux cabosses endommagées, leurs taux de contamination sont élevés et varient entre $1,10 \pm 0,84$ et $1,56 \pm 0,74 \mu\text{g/kg}$. Leurs taux moyens de contamination par ordre croissant varient respectivement de :

- $1,10 \pm 0,84 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses pourries
- $1,51 \pm 0,78 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses piquées
- $1,56 \pm 0,74 \mu\text{g/kg}$ pour les cabosses blessées

Au total, dans les fèves sèches destinées à l'exportation, l'ochratoxine A provient essentiellement des fèves issues des cabosses blessées, des cabosses piquées et des cabosses pourries.

RECOMMANDATIONS

1. Aux pouvoirs publics

- ✓ Promouvoir une politique de production de cacao de bonne qualité à travers des mesures d'incitation, de sensibilisation et de formation en direction des producteurs et des exportateurs.
- ✓ Créer, encourager et soutenir les structures de contrôle des productions nationales

2. Aux producteurs de cacao

- ✓ Respecter les recommandations relatives à la pratique de la cacao culture (y compris l'utilisation de produits phytosanitaires appropriés)
- ✓ Appliquer les bonnes pratiques de traitements post-récoltes du cacao :
 - Récolter uniquement les cabosses mures
 - Eviter de blesser les cabosses pendant la récolte ou le ramassage à la machette (ramasser les cabosses à la main)
 - Eliminer les fèves moisies et pourries pendant l'écabossage
 - Respecter la durée de fermentation
 - Brasser les fèves pendant la fermentation pour l'homogénéiser
 - Sécher les fèves sur les supports appropriés (claires, bâches, sols cimentés) et brasser régulièrement
 - Protéger les fèves de la pluie et de l'humidité pendant le séchage
 - Eviter de stocker le cacao dans des conditions d'humidité relative élevée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abramson D. Measurement of ochratoxin A in barley extracts by liquid chromatography- Mass spectrometry. *Journal of chromatography*, 1987, 391, pp 315-320.

Adama C., Godi HM., Ardjouma D., Kouassi M.B., Abba T. (2013) Cocoa beans and cocoa derivatives from Cote-D'Ivoire: investigating ochratoxin A level and assessing dietary intake adults. *Sustainable Agriculture. Research*; Vol. 2, No. 1; p 173-180.

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.

Austwick P.K.C. Balkan nephropathy. *The Practitioner*, 1981, 255, pp 1031-1038.

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.

Bastide P., Durand N., Fourny G., Gilmour M., Guyot B., Lindblom M., And Petithuguenin P. (2006) Identification of Ochratoxin A sources during cocoa post-harvest processing: Influence of harvest quality and climatic factors. 15th Intl Cocoa Res. Conf., San Jose, Costa Rica, 9-17 October 2006.

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.

Berndt E 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.

Braudeau J. Le cacaoyer : techniques agricoles et productions tropicales
IFCC, 1969, 324, pp 1-2 .

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., Rösenthaller 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., Rösenthaller 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 Immune assay. *J. Assoc. Offc. Anal. Chem.*, 1988, 71, pp 961-964.

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.

Chaminade P., Ferau D.S., Baillet A., Ferrier D. (1995) Validation d'une méthode analytique de dosage par CLHP : test de robustesse et validation de la méthode. SFSTP pharm. 5 (1):17-35

Chelkowski J., Szebiotko K., Golinski P., Buchowski M., Godlewska B., Radomska 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.

Coker R.D. Mycotoxins and their control: constraints and opportunities.

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

Commission du Codex Alimentarius. 2006. Rapport de la 1ère session du comité du codex sur les contaminants dans les aliments. Programme Mixte FAO/WHO sur les normes alimentaires. *Beijing, Chine 16-20 avril 2007. 81 P;* www.codexalimentarius.net/download/report/691/al30_41f.pdf

Commission Regulation N°. 1881/2006 (19 December 2006) Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union, L 364/4-364/24.

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., Lugnier A.A., Beck G., Rösenthaller 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., Schlegel M., Rösenthaller R., Dirheimer G. Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells. *Toxicology Letters*, 1980a, 5, pp 375-380.

Creppy E.E., Lafarge-Frayssinet C., Rösenthaller 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., 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., Vlegaar R., Rösenthaller 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., Stormer F.C., Rösenthaller R., Dirheimer G. Effects of two

metabolites of ochratoxin A, (4R)-hydroxyochratoxin A and ochratoxin α on immune response in mice. *Infection and immunity*, 1983a, 39, pp 1015-1018.

Creppy E.E., Stormer F.C., Kern D., Rösenthaller 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., Rösenthaller 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., Betbeder A.M., Gharbi A., Counord J., Castegnaro M., Bartsch H., Moncharmont P., Fouillet B., Chambon P., Dirheimer G. Human ochratoxicosis in France: 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.

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.

Dembele A., Gerard, F., Manda P. AND Nemlin, J.G. (2007). Résultats des études de recherche du devis programme OTA No. DP/IVC/2005/16 : Contamination du café et du cacao par l'ochratoxine A (OTA) en Côte d'Ivoire. Rapport de synthèse 2007. Ministère de l'Agriculture, Direction Générale des Productions et de la diversification Agricoles, République de Côte d'Ivoire.

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 chemical methods. *Mycotoxin Research*, 1995, 11, pp 37-47.

Dekant W., Van Vaka A.S. Bioactivation of nephrotoxic halo-alkenes by glutathione conjugation: Formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate β -lyase. *Drug Metabolism reviews*, 1980, 20, pp 43-83.

Di Paolo N., Guanieri A., Loi F., Sacchi A G., Mangliarotti A.M., Di Paolo A M. Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron*, 1993, 64, pp 621-625.

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.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.

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

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

Galtier P. Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal – transport sanguin de la toxine chez le rat. Ann. Rech. Vétér., 1974a, 5, pp 311-318.

Galtier P. Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal – Distribution tissulaire et élimination chez le rat. Ann. Rech. Vétér., 1974b, 5, pp 319-328.

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.

Galtier P., Charpentreau J.L., Alvinerie M. & Labouche. The pharmacokinetic profile of ochratoxin A after oral and intravenous administration. Drug Metabolism and Disposition, 1979b, 7, pp 429-434

Galtier P., Alvinerie M., Charpentreau J.L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1981, 19, pp 735-738.

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.

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., Elissade M.H., Kubena L.F., Weaver E.A. & Carrier De Clerment B.A. Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, 53, pp 1966-1970.

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., Rösenthaller 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.

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., 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., 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 Veterinärmedicin*, 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.

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.

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, beer 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., Axelsen N. H., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B., Hyldgaard-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. Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nord. Vet. Med.*, 1976, 28, pp 452-458.

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. Ochratoxins A in food. In: *Mycotoxin in food* Ed: P. Krogh. New York, Academic press, 1987, pp 97-127.

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 in induced porcine nephropathy: Diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1988, 23, pp 1-14.

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 Ochratoxicosis and its Pathologies* Ed : E. E. Creppy, M. Castegnaro, G. Dirheimer. John Libbey Eurotext INSERM., 1993, 213, pp 167-174.

Kumagai S., Aibara K. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in rat. *Toxicology and Applied pharmacology*, 1982, 64, pp 94-102.

Kumagai S. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 1988, 26, pp 753-758.

Kumari D., Sinha S. P. Effect of retinol on ochratoxin produced genotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol*, 1994, 32, pp 471-475.

Lea T., Steien K., Stormer C. Mechanism of ochratoxin a induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 1989, 107, pp 153-159.

Li S., Marquardt A., Frohlich A., Vitti T. G., Crow G. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, 145, pp 82-90.

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 W., Ackemann M. F., Lamm K. R., Hayes H. T. Selective immunospression 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 *ActaAgric.Scand*, 1983,33,pp 171-175.

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.

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. 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.

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

Mounjouenpou P., Gueule D., Tetmoun S A M., Guyot B., Fontana-Tachon A. Incidence of Pod Integrity on the Fungal Microflora and Ochratoxin-A Production in Cocoa. *Journal of Biology and Life Science*, 2012.

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., Eppley 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., 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.

Paulsch W. E., Van Egmond H. P., Schuller P. L. Thin layer chromatographic 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.

Pfohl – Leszkowicz A., Chakor K., Creppy E. E., Dirheimer G. DNA adduct formation in mice treated by ochratoxin A. In : *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Ed : M. Castegnaro, R. Plestina G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, H. Barts. Lyon, IARC Scientific Publication, 1991, 115, pp 245-253.

Pfohl – Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Gharbi A., Baudrimont I., Obrecht S., Creppy E. E., Dirheimer G. Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A. *Human ochratoxicosis and its Pathologies*, 1993 a, 231, pp 177-187.

Pfohl – Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E. E., Dirheimer G.

Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutation research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1993 c, 289, pp 265-273.

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.

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.

Projet Pilote SSTE, Termes de références pour l'étude de catégorisation des zones régions productrices de cacao en Côte d'Ivoire, juin 2006 ; site web www.cacao.ci, juin 2006 ;

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., Bartsh H. Lipid peroxydation as a possible cause of ochratoxin A toxicity *Biochemical Pharmacology.*, 1988, 37, pp 4469-4477.

Règlement (UE) N° 105/2010 de la Commission (5 février 2010), modifiant le règlement (CE) n°1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires en ce qui concerne l'ochratoxine A.

Règlement CE 1881/2006 du 19 Décembre 2006 portant fixation des limites maximales de l'ochratoxine A dans certaines denrées alimentaires.

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., VanPeteghem C. H., Stimson W. H., Smith J. E. Detection of ochratoxin A in porcine Kidneys by a monoclonal antibody-based radioimmunoassay. *Appl. And Environ Microbiol*, 1987, 53, pp 514-518.

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.

Sangaré-Tigori B., Dem AA, Kouadio HJ, Betbeder AM, Dano DS, Moukha S, Creppy EE. 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.

Sangaré-Tigori.B., Moukha.S., Kouadio.J.H., DANO. D. S., Betbeder, A. M., Achour. A. and Creppy, E. E. (2006) Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Toxicon*. 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.

Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger 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.

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., Holzapel C. W. The synthesis of ochratoxin A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Tetrahedron*, 1967, 23, pp 4449-4461.

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 ochratoxin 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 fluctuation 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.

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.

Van Blanderen P.J., Breimer D.D., Rohervello-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, pp 7083-7088.

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. Environ. Contam. Toxicol.*, 1998, 60, pp 626-631.

Wagner B. A., Buettner G. R., Burns C. P. Free radical – mediated lipid peroxydation in cells: oxidizability 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.

Working Document of the Expert Committee “Agricultural Contaminants” of the European Commission .Scientific Committee for Food. Council Meeting of 18 November 2003

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 A. 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.

Zepnik. Volkel W., DeKaot W. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 192, pp 36-44.

Zimmerli B., Dick R. Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam*, 1996, 13, pp 655-668.