



Évaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé

Delphine Canadas

► To cite this version:

Delphine Canadas. Évaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Génie des procédés. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2006. Français. ⟨NNT : 2006INPT006A⟩. ⟨tel-04578670⟩

HAL Id: tel-04578670

<https://hal.science/tel-04578670v1>

Submitted on 17 May 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

N° d'ordre : 2356

Thèse

Présentée
pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
TOULOUSE

École doctorale : Transfert, dynamique des fluides, énergie et procédés
Spécialité : Génie des procédés environnement

Par Mlle Delphine Canadas

Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de
décontamination en ochratoxine A du blé.
Les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à l'ochratoxine
A sont-ils atténués?

Soutenue le 4 juillet 2006 devant le jury composé de :

Mr Pierre Strehaiano
Mme Annie Leszkowicz
Mr Yvan Larondelle
Mr Marcel Castegnaro
Mr Richard Manderville
Mr Michel Dubois

Président du jury
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier Annie Leszkowicz pour m'avoir accueillie au sein de son équipe au cours de ces trois années de thèse, et pour m'avoir formée à la recherche. Je vous remercie plus particulièrement pour votre investissement personnel ainsi que pour le soutien scientifique que vous m'avez apporté au cours de ces mois de rédaction.

Je remercie la société Goëmar pour m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce travail, ainsi que pour son soutien financier. Je remercie plus particulièrement Mrs Michel Dubois et Christian Coste pour leur soutien au cours de ces trois années de thèse. Michel, merci de m'avoir consacré une part importante de votre temps au cours de ces mois de rédaction. Merci également de m'avoir familiarisée avec votre entreprise lors de ma venue à Saint-Malo ainsi que de m'avoir formée, en collaboration avec Anne-Gaëlle Désprès, au procédé Oxygreen®. Votre investissement n'est pas encore terminé puisque vous avez accepté de porter un jugement sur mon travail, et je vous en remercie.

Merci à Mr le Pr Yvan Larondelle et le Dr Marcel Castegnaro d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de cette thèse et de m'accorder de votre temps. Merci également pour vos commentaires scientifiques quant à ce travail.

I thank Pr Manderville, from Guelph University, Canada for his participation as member of the jury. My English is not fluent; nevertheless I hope that the reading of my thesis in English will be easier than in French.

Merci également à Mr le Pr Pierre Strehaiano, qui a accepté de présider cette thèse, et de juger ce travail.

Je tiens à remercier Mr le Pr Heinz Schmeiser qui m'a accueillie dans son laboratoire pour tester la génotoxicité par leur méthode de détection des adduits à l'ADN, et qui a su rendre mon séjour en Allemagne très agréable, et inoubliable. Merci également à tous vos collaborateurs du *Deutsche Krebs Forschung Zenter* qui m'ont permis, avec vous, de me familiariser avec la culture allemande.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire, que ce soient les « anciennes » Anne, Agnès, Virginie, Josianne qui ont su contribuer à la bonne ambiance générale, ou les « nouveaux », Jovica, Jelena, Chi, Dalal, Marianna et Chakib pour leur soutien technique et moral.

Je remercie plus particulièrement Anne, Agnès, Virginie, Delphine, Sonia et Emilie pour leurs encouragements, et leur soutien, mais surtout pour leur amitié en dehors du labo. Merci également à tous mes amis, qui ont su être là au cours de ces années.

Enfin, je remercie ma famille pour leurs encouragements et leur soutien. Merci de croire si fort en moi, vous m'avez permis d'aller au bout de cette thèse. Merci à Papa, Maman, lulu et Tidou de m'avoir aidée dans la thèse, mais surtout pour tout ce que vous m'avez apporté et m'apportez encore. Un petit clin d'œil à mon parrain, en souvenir des discussions sur la Thèse avec un grand T...Finalement, tu avais raison... Je ne m'étendrai pas plus ici, vous savez tous les sentiments que j'éprouve à votre égard, je vous adore tous autant que vous êtes, vous êtes ma force et ma motivation.

Résumé

L'ingestion des parties périphériques du grain de blé, dans lesquelles sont concentrés la majorité des vitamines et minéraux, par la consommation d'aliments complets (farines complètes, pain complet, pâtes complètes) constitue un atout nutritionnel évident. Cette consommation est limitée par sa faible digestibilité ainsi que par la présence de contaminants chimiques et biologiques présentant un risque pour la santé humaine et animale. L'ozonation du blé par le procédé Oxygreen® facilite la digestibilité des parties périphériques du grain de blé et en élimine les contaminants.

L'objet de cette thèse consiste plus spécifiquement en l'étude du potentiel décontaminant du procédé Oxygreen® en Ochratoxine A, mycotoxine fréquemment retrouvée dans le blé et dont la présence est limitée par une réglementation Européenne. Le traitement d'une solution aqueuse d'OTA par l'ozone conduit à une dégradation rapide de l'OTA, sans formation de dérivés. L'ozonation du blé contenant de l'OTA en réduit le taux de contamination. L'étude de la cytotoxicité, de la génotoxicité *in vitro* révèle que l'application du procédé Oxygreen® sur un blé de bonne qualité ne conduit pas à l'apparition de phénomènes de toxicité. La connaissance des effets toxiques de l'OTA est nécessaire à la détermination des doses maximales journalières tolérables pour l'homme par extrapolation des résultats obtenus chez l'animal. L'innocuité du procédé Oxygreen® ainsi que les effets d'une exposition subchronique à de faibles doses d'OTA ont été évalués chez des rats mâles et femelles. L'exposition, même faible (40ng/kg pc/jour l'OTA conduit à l'accumulation de l'OTA dans le compartiment sanguin ainsi que dans les différents organes. Des adduits à l'ADN sont observés dans les reins et foies des animaux. Bien que l'exposition des rats recevant un blé ozoné soit réduite, les études *in vitro* et *in vivo* suggèrent des précautions dans l'utilisation de ce procédé pour la décontamination en OTA du blé. Des optimisations de ce procédé sont à envisager afin d'augmenter l'efficacité de la décontamination.

Mots clés : Ochratoxine A, Oxygreen®, ozone, toxicocinétique, décontamination, adduits à l'ADN, mycotoxine, toxicité.

Abstract

Ingestion of complete flour or complete bread has the advantage of providing a food with a high nutritional value (vitamins, trace elements). The consumption of these foods is limited because bran is not easy to digest and concentrates contaminants which could impact human and animal health. Ozone application via Oxygreen® process increases their digestibility and allows reducing the contamination rate.

The aim of this thesis is to analyse the safety of Oxygreen® process applied on OTA contaminated wheat. OTA is a nephrotoxic and carcinogenic mycotoxin; its amount in food is regulated by EU community. The treatment of an aqueous OTA solution by ozone rapidly destroys OTA without generating new derivatives. In the same way, ozone applied on wheat reduces OTA level. In vitro analyses of cytotoxicity and genotoxicity reveal that Oxygreen® process applied on high quality wheat does not lead to any toxic effects. Oxygreen® safety and the effects of low OTA exposure were investigated in a sub-chronic study on male and female rats. Even with exposure as low as 40 ng/kg bw/day, OTA accumulates in blood and organs, leading to DNA adducts formation in target organs (liver and kidney). The reduction of rats exposure does not result in the total decrease of OTA toxic effects. This study suggests to take care about Oxygreen® use in view of mycotoxin decontamination, and to optimize the process.

Key words: Ochratoxin A, Oxygreen®, ozone, toxicokinetic, decontamination, DNA adducts, mycotoxin, toxicity.

Remerciements.....	2
Liste des tableaux, figures et graphes	9
Liste des publications et communications orales	16
<u>Introduction bibliographique</u>	
1. Le Blé, caractéristiques, aspects nutritionnels et normes de qualité.....	20
1.1 Le blé, description et caractéristiques	20
1.1.1 Eléments de botanique et morphologie	20
1.1.2 Composition des différents tissus du blé (Surget & Baron, 2005)	20
1.1.3 La couche à aleurone, un tissu particulier du blé	21
1.2. Les critères de qualité du blé	22
1.2.1 Les critères de qualité du blé au niveau mondial	22
1.2.2 Les standards de qualité en Europe	23
1.3 La transformation du blé dans les procédés agro-alimentaires	24
1.3.1 Méthode de transformation du blé	24
1.3.2 Les secteurs d'utilisation du blé	25
1.3.2.1 Utilisation du blé en alimentation humaine	25
1.3.2.2 Utilisation du blé en alimentation animale	25
1.4 La consommation de blé : un paradoxe entre nutrition et sécurité	26
2. Un contaminant biologique du blé : l'Ochratoxine A	27
2.1 Présentation de l'ochratoxine A	27
2.1.1 Définition et origine des mycotoxines	27
2.1.2 Présentation de l'ochratoxine A	28
2.1.2.1 Caractéristiques biochimiques de l'Ochratoxine A.....	28
2.1.2.2 Production de l'OTA.....	28
2.2 L'OTA un risque pour la santé humaine et animale	29
2.2.1 Toxicocinétique et toxicité de l'OTA.....	29
2.2.1.1 Toxicocinétique de l'OTA	29
2.2.1.1.1 Absorption de l'OTA et demi-vie dans le compartiment sanguin	29
2.2.1.1.2 Distribution de l'OTA aux organes, métabolisation, et excrétion	30
2.2.1.1.2.1 Distribution de l'OTA.....	30
2.2.1.1.2.2 Transport de l'OTA vers les organes	30
2.2.1.1.2.3 Excrétion et métabolisation de l'OTA	31
2.2.1.2 Effets toxiques de l'OTA.....	32
2.2.1.2.1 Toxicité aiguë	32
2.2.1.2.2 Néphrotoxicité.....	33
2.2.1.2.3 Carcinogénicité.	33
2.2.1.2.4 Génotoxicité et mutagénicité	34
2.2.2 Exposition de l'homme à l'OTA : Evaluation et gestion du risque.....	36
2.2.2.1 Estimation de l'exposition humaine à l'OTA.....	36
2.2.2.1.1 Contamination en OTA des denrées alimentaires et exposition de l'homme	36
2.2.2.1.2 Suivi des marqueurs d'exposition.....	38
2.2.2.2 Contamination par l'OTA de l'ensemble de la chaîne alimentaire	38
2.2.2.3 Règlementations et recommandations	41
3. Les procédés de décontamination	42
3.1 Stratégie préventive : limitation de la survenue des contaminations	42
3.1.1 Mise en place d'un plan de contrôle et d'analyse des points critiques (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point).....	42
3.1.2 Le suivi des « bonnes pratiques agricoles »	42
3.1.2.1 Pratiques recommandées précédant la récolte	42
3.1.2.2 Pratiques de stockage	43
3.2 Stratégie curative : la décontamination.....	44
3.2.1 Méthodes biologiques de décontamination	44
3.2.2 Méthodes physiques de décontamination	46
3.2.2.1 Situation actuelle	46
3.2.2.2 Le procédé Oxygreen® : une solution pour la décontamination en OTA des céréales ?	47
3.2.2.2.1 Le principe actif : l'ozone	47

3.2.2.2.1.1 Qu'est-ce que l'ozone	47
3.2.2.2.1.2 La réactivité de l'ozone	47
3.2.2.2.1.3 L'utilisation industrielle de l'ozone	49
3.2.2.2.2 Développement du procédé Oxygreen®	52
3.2.2.2.2.1 Applications novatrices du procédé Oxygreen®	53
3.2.2.2.2.1 Le procédé Oxygreen® pour l'obtention de farines à haut niveau de sécurité alimentaire	54
Matériel et Méthode	
1. Matériel et description des principaux tests réalisés au cours de l'étude in vitro	58
1.1 Description des cultures cellulaires utilisées	58
1.1.1 Produits utilisés	58
1.1.2 Conditions de culture	58
1.1.2.1 Mise en culture des cellules	58
1.1.2.2 Amplification de la culture cellulaire	58
1.1.2.3 Conservation des cellules	59
1.2 Etude de la cytotoxicité	59
1.2.1 Test au MTT	59
1.2.1.1 Produits et principe	59
1.2.1.2 Réalisation du test	59
1.2.2 Test à la LDH	59
1.2.2.1 Produits et principe	59
1.2.2.2 Réalisation du test	60
2. Etude in vivo	61
2.1 Contamination artificielle en OTA du blé et traitement Oxygreen®	61
2.2 Modèle animal et étude des paramètres physiologiques et biochimiques	61
2.2.1 Modèle animal et traitement des animaux	61
2.2.2 Obtention du matériel biologique	62
2.2.3 Etude des paramètres biochimiques et physiologiques	62
3. Etude de la génotoxicité	62
3.1 Produits	62
3.1.1 Les produits chimiques	62
3.1.2 Les enzymes	63
3.1.3 Matériels de chromatographie	63
3.1.4 Les adduits standard	63
3.2 Principe	64
3.3 Obtention de l'ADN et marquage des adduits	64
3.3.1 Extraction et purification de l'ADN	64
3.3.1.1 Extraction de l'ADN	64
3.3.1.1.1 Première étape de l'extraction à partir des cellules	64
3.3.1.1.2 Première étape de l'extraction à partir des organes	64
3.3.1.2 Purification et dosage de l'ADN	65
3.3.1.2.1 Purification de l'ADN	65
3.3.1.2.2 Dosage de l'ADN et contrôle du degré de pureté	65
3.3.2 Marquage des adduits	65
3.3.2.1 Hydrolyse de l'ADN	65
3.3.2.2 Enrichissement à la nucléase P1	66
3.3.2.3 Marquage des adduits au ³² P en position 5'	66
3.3.2.4 Etapes de contrôle	66
3.3.2.4.1 Test d'efficacité de l'hydrolyse : marquage des nucléotides normaux	66
3.3.2.4.2 Test d'efficacité de l'enrichissement par la nucléase P1	66
3.3.2.4.3 Efficacité du marquage des adduits par la T4 polynucléotide kinase	67
3.3.3 Séparation et identification des adduits	67
3.3.3.1 Séparation par chromatographie multidimensionnelle sans « contact-transfert »	67
3.3.3.2 Séparation par chromatographie multidimensionnelle avec « contact-transfert »	67
3.3.3.2.1 Dépôt des échantillons et purification des adduits (D1)	67

3.3.3.2.2 Transfert des adduits par contact et migration D2	68
3.3.3.2.3 Migration D3	69
3.3.3.2.4 Migration D4	69
3.3.4 Autoradiographie et quantification des adduits.	70
4. Techniques analytiques	70
4.1 Produits et matériel	70
4.1.1 Réactifs et petit équipement	70
4.1.2 Appareillage.....	70
4.2 Extraction des mycotoxines	71
4.2.1 Principe général.....	71
4.2.2 Extraction à partir du blé	71
4.2.3 Extraction à partir du sang, sérum et urines	72
4.2.4 Extraction à partir des organes	72
4.3 Préparation de solutions standard de toxines.....	73
4.3.1 OTA, OTB, OTHQ.....	73
4.3.2 Préparation de dérivés standard de l'OTA	73
4.3.2.1 Préparation de l'OP-OA , forme ouverte de l'OTA.....	73
4.3.2.2 Préparation des formes OT α et OT β	73
4.3.3.3 Préparation de la forme méthylée de l'OTA	74
4.4 Analyse par HPLC	74
4.4.1 Principe	74
4.4.2 Description du système	74
4.4.3 Paramètres d'analyse	75
4.4.3.1 Analyses HPLC réalisées en conditions isocratiques	75
4.4.3.2 Analyses HPLC réalisées en conditions de gradients.....	75
4.4.4 Protocole pour l'analyse d'échantillons par HPLC	76
4.5 Analyse en spectrométrie de masse.....	76
4.5.1 Principe	76
4.5.2 Description du système.	76
4.5.3 Préparation des échantillons pour l'analyse en nano-ESI-IT-MS.....	77
4.5.4 Conditions d'analyse de l'OTA et de ses métabolites.....	77
4.6 Traitement des données par le logiciel de statistiques	77
Résultats	
Chapitre 1 : le procédé Oxygreen® pour l'élimination des mycotoxines présentes sur une matrice simple ou complexe	80
1.1. Description succincte des mycotoxines.....	80
1.1.1 L'Ochratoxine A	80
1.1.2 La Citrinine	80
1.2 Décontamination d'une solution aqueuse d'OTA et/ou de CIT par l'ozone	81
1.2.1 Montage, production de l'ozone et mode d'action de l'ozone	81
1.2.1.1. Description du montage	81
1.2.1.2. Production de l'ozone par l'ozoneur	82
1.2.1.3. Description des solutions aqueuses de mycotoxines et échantillonnage	82
1.2.1.4 Mode d'action de l'ozone et consommation de l'ozone par les solutions au cours du temps	82
1.2.2 Cinétique de dégradation des mycotoxines en solution	84
1.2.2.1 Analyse par HPLC de la concentration résiduelle en mycotoxines	84
1.2.2.1.1 Principe de l'analyse par HPLC.....	84
1.2.2.1.2 Résultats de l'analyse par HPLC	84
1.2.2.2 Analyse en spectrométrie de masse.....	85
1.2.2.2.1 Principe de la spectrométrie de masse	85
1.2.2.2.2 Résultats de l'analyse en spectrométrie de masse	85
1.2.3 Conclusion	86
1.3 Décontamination de l'OTA présente sur une matrice complexe.....	86
1.3.1 Action de l'ozone sur le blé.....	86
1.3.2 Traitement par le procédé Oxygreen® du blé.....	87

1.3.2.1 Description du système.....	87
1.3.2.2 Paramètres choisis.....	88
1.3.3. Décontamination en OTA du blé par le procédé Oxygreen®	88
1.3.3.1 Description des lots de blé utilisés pour l'étude.....	88
1.3.3.2 Potentiel décontaminant du procédé Oxygreen®.....	89
1.3.4 Influence du traitement Oxygreen® sur la qualité nutritionnelle et sur les propriétés technologiques du blé	91
1.3.4.1 Incidence sur la qualité nutritive du blé	91
1.3.4.2 Incidence sur la qualité technologique du blé.....	91
1.4. Conclusion et discussion des résultats du chapitre 1	92
Chapitre 2 : Evaluation du procédé Oxygreen® : Etude de la toxicité sur modèle cellulaire <i>in vitro</i>	93
2.1 Etude du potentiel toxique des solutions de mycotoxines traitées par le procédé Oxygreen® sur modèle cellulaire <i>in vitro</i>	93
2.1.1 Choix des modèles cellulaires	93
2.1.2 Etude de la cytotoxicité	93
2.1.2.1 Principe général	93
2.1.2.2 Résultats	94
2.1.2.2.1 Potentiel cytotoxique sur cellules rénales humaines HK-2	94
2.1.2.2.1.1 Etude de l'exposition des cellules rénales humaines HK-2 à des solutions d'OTA et/ou de CIT	94
2.1.2.2.1.2 Exposition des cellules rénales humaines HK-2 aux solutions contaminées ou non en mycotoxines, et traitées ou non par l'ozone	95
2.1.2.2.2 Etude du potentiel cytotoxique sur modèle cellulaire bronchique humain WI 26.....	96
2.1.2.2.2.1 Exposition des cellules bronchiques humaines WI 26 à des solutions d'OTA et/ou de CIT.....	96
2.1.2.2.2.2 Exposition des cellules bronchiques humaines WI 26 aux solutions contaminées ou non en mycotoxines et traitées ou non par l'ozone	97
2.1.3. Etude du potentiel génotoxique des solutions ozonées	99
2.1.3.1 Principe général	99
2.1.3.2 Résultats	99
2.1.4 Conclusion et discussion de l'étude <i>in vitro</i> du potentiel toxique des solutions de mycotoxines ozonées.....	100
2.2 Etude du potentiel toxique d'extraits de blé obtenus à partir des blés contaminés en OTA et traités ou non par Oxygreen® sur modèle cellulaire bronchique	101
2.2.1 Constitution des extraits de blé.....	101
2.2.2 Potentiel cytotoxique des différents lots de blé, traités ou non par Oxygreen®.....	102
2.2.3 Potentiel génotoxique des différents lots de blé.....	104
2.2.3.1 Potentiel génotoxique de solutions pures d'OTA sur les cellules bronchiques.....	104
2.2.3.2 Potentiel génotoxique des extraits de blé contaminés en OTA sur cellules bronchiques humaines	106
2.2.3.3 Potentiel génotoxique des extraits de blé traités par le procédé Oxygreen® sur les cellules pulmonaires	108
2.2.4 Conclusions et discussion des résultats concernant le potentiel toxique des extraits de blé traités ou non par le procédé Oxygreen®	110
2.3 Innocuité du procédé Oxygreen® appliqué sur un blé de qualité particulière : le blé germé.....	111
2.3.1 Description des lots de blé germés	111
2.3.1.1 Qualité du blé et temps de chute de Hagberg	111
2.3.1.2. Temps de Hagberg des lots de blé germés	112
2.3.2 Etude du potentiel cytotoxique des différents lots de blé germés ou non, et traités ou non par le procédé Oxygreen®	112
2.3.2.1. Evaluation de l'inhibition de la prolifération cellulaire (test au MTT)	113
2.3.2.1.1. Exposition des cellules au blé témoin Meunier ozoné ou non ozoné.....	113
2.3.2.1.2. Exposition des cellules à des extraits de blé germés et incidence sur la prolifération cellulaire	114
2.3.2.1.3 Exposition des cellules à des extraits de blé pré germés, traités par Oxygreen®, et incidence sur la prolifération cellulaire	114
2.3.2.2. Evaluation de la mortalité cellulaire, test à la lactate deshydrogénase (LDH)	115

2.3.2.2.1. Exposition des cellules au blé témoin non germé ozoné ou non ozoné	116
2.3.2.2.2. Exposition des cellules à des extraits de blé germés, et incidence sur la prolifération cellulaire	117
2.3.2.2.3 Exposition des cellules à des extraits de blé germés, traités par Oxygreen®, et incidence sur la prolifération cellulaire	117
2.3.3 Etude du potentiel génotoxique des extraits de blé germés ou non, et traités ou non par Oxygreen®	118
2.3.3.1 Potentiel génotoxique de l'extrait de blé non germé, traité ou non par le procédé Oxygreen®	118
2.3.3.2 Potentiel génotoxique des extraits de blé germés	119
2.3.3.3 Potentiel génotoxique des extraits de blé germés traités par le procédé Oxygreen®	120
2.3.5. Conclusions	122
2.4 Conclusion et discussion générale des résultats concernant l'innocuité du procédé Oxygreen® in vitro	124
Chapitre 3 : Etude sub-chronique d'une exposition de rats à l'OTA : toxicocinétique, toxicité générale et génotoxicité de l'OTA <i>in vivo</i>	125
3.1 Mise en place de l'étude et exposition des rats à l'OTA	125
3.1.1 Description du modèle d'étude <i>in vivo</i>	125
3.1.2 Alimentation des animaux et exposition des rats à l'OTA	126
3.2 Toxicocinétique de l'OTA	127
3.2.1 OTA sérique	127
3.2.2 Distribution et métabolisation de l'OTA	128
3.2.2.1 Distribution de l'OTA dans les différents organes	128
3.2.2.2 Métabolisation de l'OTA	131
3.2.2.2.1 Identification et description des métabolites	131
3.2.2.2.2 Métabolisation de l'OTA dans le foie et le rein	133
3.2.2.2.2.1 Métabolisation au niveau hépatique	133
3.2.2.2.2.2 Métabolisation au niveau rénal	134
3.2.2.2.2.6 Résumé	136
3.2.3 Excrétion urinaire de l'OTA et de ses métabolites	136
3.3 Potentiel toxique de l'OTA	139
3.3.1 Toxicité générale : suivi des paramètres biologiques et physiologiques	139
3.3.1.1 Evolution pondérale des rats	139
3.3.1.1.1 Gain de poids des animaux	139
3.3.1.1.2 Poids des organes	141
3.3.1.1.2.1 Poids relatif des reins	141
3.3.1.1.2.2 Poids relatif du foie	142
3.3.1.1.2.3 Poids relatif du thymus	143
3.3.1.1.2.4 Poids relatif des poumons, des testicules, des ovaires, du cœur et du cerveau	143
3.3.1.1.3 Conclusions	143
3.3.1.2 Hématologie et Biochimie du sang	145
3.3.1.2.1 Hématologie	145
3.3.1.2.1.1 Taux leucocytaire sanguin	145
3.3.1.2.1.2 Taux érythrocytaire	145
3.3.1.2.1.3 Facteurs de la coagulation	146
3.3.1.2.2 Biochimie sanguine	148
3.3.1.2.2.1 Concentration sanguine en électrolytes	148
3.3.1.2.2.2 Concentration sanguine en glucose, cholestérol, urée, créatinine et triglycérides	152
3.3.1.2.2.3 Concentration sanguine en phosphatase alcaline (ALP), aspartate amino transférase (ASAT), alanine amino transférase (ALAT)	155
3.3.2 Génotoxicité	157
3.3.2.1 Potentiel génotoxique de l'OTA au niveau rénal	157
3.3.2.1.1 Etude de la formation des adduits à l'ADN par la méthode chromatographique multidimensionnelle	157
3.3.2.1.2 Etude des adduits à l'ADN de rein par la méthode chromatographique bidimensionnelle avec contact-transfert	160

3.3.2.2 Potentiel génotoxique au niveau hépatique	161
3.3.2.2.1 Séparation des adduits à l'ADN de foie par chromatographie multidimensionnelle	161
3.3.2.2.2 Séparation des adduits à l'ADN de foie par chromatographie bidimensionnelle avec contact-transfert.....	163
3.3.2.5 génotoxicité et métabolisation	164
Conclusions apportées par l'étude sub-chronique d'une exposition de rats à l'OTA : toxicocinétique, toxicité générale et génotoxicité de l'OTA in vivo	166
Chapitre 4 : Incidence de la décontamination du blé par le traitement Oxygreen® sur la toxicité	172
4.1 Etude in vivo et exposition des rats à l'OTA	172
4.2 Toxicocinétique de l'OTA résiduelle	172
4.2.1 OTA sérique	172
4.2.2 Distribution et métabolisation de l'OTA.....	174
4.2.2.1 Distribution de l'OTA dans les différents organes	174
4.2.2.2. Métabolisation dans les différents organes.....	175
4.2.2.2.1 Métabolisation au niveau hépatique	175
4.2.2.2.2 Métabolisation au niveau rénal	177
4.2.3 Excrétion urinaire de l'OTA et de ses métabolites.....	179
4.2.3.1 Elimination urinaire de l'OTA.....	179
4.2.3.1 Elimination urinaire des métabolites de l'OTA	180
4.2.4 Conclusions concernant la toxicocinétique de l'OTA résiduelle	182
4.3 Potentiel toxique de l'OTA résiduelle.....	184
4.3.1 Toxicité générale : suivi des paramètres biologiques et physiologiques	184
4.3.1.1 Evolution pondérale des rats	184
4.3.1.1.1 Gain de poids des rats.....	184
4.3.1.1.2 Poids des organes.....	185
4.3.1.1.2.1 Poids relatif des reins	185
4.3.1.1.2.2 Poids relatif du foie	186
4.3.1.1.2.3 Poids relatif du thymus	187
4.3.1.2.1 Hématologie	188
4.3.1.2.1.1 Taux leucocytaire sanguin	188
4.3.1.2.1.2 Taux érythrocytaire	189
4.3.1.2.1.3 Facteurs de la coagulation.....	190
4.3.1.2.2 Biochimie sanguine.....	192
4.3.1.2.2.1 Concentration sanguine en électrolytes	192
4.3.1.2.2.2 Concentration sanguine en glucose, cholestérol, urée, créatinine et triglycérides	197
4.3.1.2.2.3 Concentration sanguine en ALP, ASAT, ALAT.....	201
4.3.1.2.3 Conclusions.....	202
4.3.2 Génotoxicité	202
4.3.2.1 Potentiel génotoxique de l'OTA résiduelle au niveau rénal	202
4.3.2.2 Potentiel génotoxique au niveau hépatique	203
4.3.2.5 Conclusions	205
<u>Conclusion et discussion</u>	
Conclusion, discussion générale, et perspectives.....	206
Perspectives.....	213
Références bibliographiques	215

Liste des tableaux

tableau 1.: Composition du blé en divers éléments exprimé en % sur la matière sèche. D'après Feillet, 2000.....	21
tableau 2.: Teneur en vitamines et en minéraux de la couche à aleurone (mg pour 100 g de couche à aleurone) d'après Lopez et al, 2001	22
tableau 3.: Critères de qualité du blé tendre et du blé dur au niveau mondial. D'après norme CODEX 199-1995	22
tableau 4.: Critères Européens de qualité sur le blé dur et le blé tendre.....	23
tableau 5.: contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (CAST, 1989).....	27
tableau 6.: Données concernant la fréquence et le taux de contamination en OTA de divers aliments. D'après SCOOP Task 3.2.7, European 2002).....	36
tableau 7.: potentiel de dégradation de différentes enzymes et microorganismes (d'après Varga et al, 2005).....	45
tableau 8.: Temps de rétention en minutes de l'OTA et de ses métabolites sur le gradient « Faucet ».	76
tableau 9.: Concentration résiduelle en OTA et en CIT dans les solutions aqueuses traitées à l'ozone. «Ldd : inférieur à la limite de détection	84
tableau 10.: taux de contamination en OTA des différents lots de blé, taux résiduel d'OTA sur les lots de blé décontaminés et % de décontamination.	89
tableau 11.: résultat de l'analyse du taux de contamination en OTA des différents lots de blé par l'IFBM.	90
tableau 12.: concentration en OTA dans le milieu de culture des cellules exposées aux divers extraits de blé non dilués, traités par le procédé Oxygreen® (cadre et fond verts), ou non traités par le procédé (cadre et police noirs).	102
tableau 13.: quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10 ⁸ nucléotides, dans les cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à l'OTA pendant 24heures.	105
tableau 14.: quantification et dénomination des adduits à l'ADN des cellules WI26 exposées à des extraits de blés contaminés à des doses croissantes en OTA (adduits/10 ⁸ nucléotides).	107
tableau 15.: quantification en adduits/10 ⁸ nucléotides et dénomination des adduits à l'ADN des cellules WI 26 exposées 24 heures aux différents extraits de blé, traités ou non par le procédé Oxygreen®.	108
tableau 16.: Identification des différents lots de blé et rappel de leur temps de chute de Hagberg.	112
tableau 17.: quantification des adduits à l'ADN des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux différents extraits de blé.	120
tableau 18.: quantification des adduits à l'ADN des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux extraits de blé germés ou non, et traités par le procédé Oxygreen®. ldd : limite de détection ; ldq : limite de quantification.	121
tableau 19.: contamination en OTA du blé, consommation journalière de blé et exposition à l'OTA des rats femelles des différents groupes	126
tableau 20.: contamination en OTA du blé, consommation journalière de blé et exposition à l'OTA des rats mâles des différents groupes	126
tableau 21.: temps de rétention et identification des composés détectés à l'HPLC sur le gradient « Faucet ».	131
tableau 22.temps de rétention et identification des composés détectés à l'HPLC sur le gradient « Faucet ».....	138
tableau 23.: poids des rats femelles 12 jours avant le début de l'exposition (période d'acclimatation), au premier jour de l'exposition à l'OTA, 28 jours après le début de l'exposition à l'OTA et gain de poids sur la période de traitement des rats.	140
tableau 24.: poids des rats mâles 12 jours avant le début de l'exposition (période d'acclimatation), au premier jour de l'exposition à l'OTA, 28 jours après le début de l'exposition à l'OTA et gain de poids sur la période de traitement des rats.	140
tableau 25.: variations du poids total, du gain de poids ainsi que du poids relatif des différents organes en fonction du sexe et du groupe.	144
tableau 26. : présence ou absence des différents métabolites dans les différents organes et dans les urines en fonction du sexe des animaux.	169
tableau 27. : contamination en OTA du blé exprimée en ppb, consommation journalière de blé exprimée en g/jour et exposition à l'OTA exprimée en µg/kg pc/jour des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (police verte), ou non traité (police noire).	172
tableau 28. : contamination en OTA du blé exprimée en ppb, consommation journalière de blé exprimée en g/jour et exposition à l'OTA exprimée en µg/kg pc/jour des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (police verte), ou non traité (police noire).	172
tableau 29. : récapitulatif des variations observées, concernant la quantité de métabolites détectée dans le foie, les reins et les urines de rats, suite à la diminution de l'exposition des rats (groupe 5 versus groupe 5Ox® et groupe 6 versus groupe 6Ox®) et quand les rats sont exposés à une même dose d'OTA via un blé traité ou non par Oxygreen® (groupe 5 versus groupe 6Ox®).	183

Liste des figures

Figure 1.: Structure du grain de blé (d'après Surget & Barron, 2005).....	20
Figure 2. : Filière de transformation française du blé d'après le document du conseil national de l'alimentation, Céréaliéristes français, « présentation de la filière céréalière française ».....	24
Figure 3.: structure de l'Ochratoxine A.....	28
Figure 4.: Description des différents transporteurs présents au niveau du foie et du rein des rats et des hommes (d'après Kusunura & Sugiyama, 2002).	31
Figure 5.: Système de production d'ozone par décharge électrique.....	49
Figure 6.: modèle d'insertion du traitement Oxygreen® dans le diagramme meunier	54
Figure 7.: disposition des points de dépôt des échantillons d'ADN contenant les adduits marqués radioactivement et représentation du sens de migration des adduits en D2, D3 et D4.	67
Figure 8.: disposition des points de dépôt des échantillons d'ADN contenant les adduits marqués radioactivement.	68
Figure 9.: représentation du transfert des adduits présents sur le point de dépôt découpé sur une nouvelle plaque de chromatographie pour la séparation des adduits au cours de la migration D2.	68
Figure 10.: Rotation de la plaque de chromatographie après la séparation des adduits en D2 et séparation des adduits selon la seconde dimension en D3.....	69
Figure 11.: Séparation des adduits après les migrations D2 et D3, et sens de migration en D4 des adduits.....	69
Figure 12.: représentation des différents éléments composant la chaîne HPLC.....	74
Figure 13.: composition du gradient en chacune des deux phases A et B au cours du temps de l'analyse HPLC.	75
Figure 14.: structure chimique de la CIT	81
Figure 15.: montage utilisé pour le traitement des solutions contaminées en mycotoxines par l'ozone.	81
Figure 16. Pénétration de l'ozone en fonction de la pré-humidification du grain. Adapté de P. Feillet, 2000.	86
Figure 17.: Schéma du réacteur dans lequel sont placés les grains de blé en vue de leur ozonation. Adapté du Brevet N° FR 9915955	87
Figure 18.: Description des différents lots de blé entrant dans cette étude. Rappel des codifications des différents lots de blé, de leur taux de contamination en OTA et du traitement subi.	89
Figure 19.: Structure des adduits standards OTA O-C8 et C-C8 sur la désoxyguanosine monophosphate.....	106
Figure 20.: Structure de la forme glucoside inactive (gauche) et de la forme aglucone active (droite) du DIMBOA et du DIBOA.....	122
Figure 21.: structure du DIMBOA et de son dérivé désoxy le HMBOA.....	123
Figure 22.: Structure de l'AMBOA, métabolite acétylé de l'HMBOA, et formation d'un adduit à l'ADN par liaison de l'AMBOA sur le C8 de la guanine D'après Hashimoto et al, 1991 ; Ishizaki et al, 1982.	123
Figure 23. : évolution schématique de la concentration en OTA dans le compartiment sanguin des rats exposés à des doses croissantes d'OTA.	166
Figure 24. : modélisation des effets toxiques de l'OTA en fonction de la dose d'exposition.....	211

Liste des graphes

Graphe 1. : Contribution de chaque denrée alimentaire dans l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA . D'après SCOOP Task 3.2.7, European, 2002.	37
Graphe 2.: Part des différents aliments dans la consommation moyenne d'OTA dans l'ensemble de la population Française (en ng/jour ×kg poids corporel) (d'après Verger et al, 1999).....	37
Graphe 3.: Evolution de l'absorbance suite à la lyse de la totalité des cellules WIensemencées sur la plaque de prolifération, en fonction du nombre de cellules présentes.	60
Graphe 4.: exemple de diagramme en boîte à moustache, généré par le logiciel SPSS faisant apparaître la valeur médiane, l'intervalle interquartile ainsi que les valeurs extrêmes des résultats obtenus pour chacun des différents groupes.	78
Graphe 5.: consommation d'ozone en g/secondes par les solutions de mycotoxines au cours du traitement.....	83
Graphe 6.: évolution du pH moyen des diverses solutions ozonées en fonction de la durée de l'ozonation.	83
Graphe 7.: pourcentage de cellules HK-2 vivantes suite à l'exposition pendant 24 heures à des concentrations croissantes en mycotoxines, comprises entre 0 et 100µM.	94
Graphe 8.: effet de l'exposition pendant 24 heures des cellules HK-2 à un mélange des deux toxines, OTA et CIT, sur le pourcentage de cellules vivantes par rapport à un témoin non exposé.....	95
Graphe 9.: Pourcentage de survie, par rapport au témoin cellulaire non exposé, des cellules HK-2 exposées aux différentes solutions de mycotoxines, contaminées à 100µg/L, ou de l'eau pure, ozonées pendant 0, 5, 10, 15 et 20 minutes..	96
Graphe 10.: Viabilité des cellules bronchiques WI exposées pendant 24 heures à diverses concentrations en OTA. Source : Thèse A. Molinié (2004).	97

Graphe 11.: viabilité des cellules bronchiques humaines WI exposées 24 heures à diverses concentrations en CIT. D'après la thèse d'A. Molinié (2004).....	97
Graphe 12.: Pourcentage de survie, par rapport au témoin cellulaire non exposé, des cellules WI 26 exposées aux différentes solutions de mycotoxines, contaminées à 100µg/l, ou à de l'eau pure, ozonées pendant 0, 5, 10, 15 et 20 minutes...	98
Graphe 13.: Pourcentage de cellules vivantes après exposition des cellules pendant 24 heures aux différents extraits de blés, ainsi qu'à leurs dilutions, blés artificiellement ou naturellement contaminés en OTA et traités ou non par le procédé Oxygreen®.....	103
Graphe 14.: quantification et dénomination des adduits à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées à des extraits de blés contaminés à des doses croissantes en OTA (adduits/10 ⁸ nucléotides).	107
Graphe 15.: quantification en adduits/10 ⁸ nucléotides et dénomination des adduits à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées 24 heures aux différents extraits de blé, traités ou non par le procédé Oxygreen®.	109
Graphe 16.: évaluation par le test au MTT de la viabilité des cellules épithéliales bronchiques humaines suite à l'exposition de celles-ci à l'extrait de blé témoin traité ou non par le procédé Oxygreen®, pendant 24 heures.....	113
Graphe 17.: évaluation par le test au MTT de la viabilité des cellules après exposition pendant 24h à diverses concentrations en extraits de blé non traités par le procédé Oxygreen®.....	114
Graphe 18.: évaluation par le test au MTT de la viabilité des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux extraits de blé germés ou non germés et traités par le procédé Oxygreen®.	115
Graphe 19.: évaluation par le test à la LDH de la viabilité des cellules pulmonaires humaines après exposition 24 heures à diverses concentrations en extraits de blé témoin « Meunier », traité ou non par le procédé Oxygreen®.....	116
Graphe 20.: évaluation par le test à la LDH de la viabilité des cellules WI26 exposées à différentes concentrations en extraits de blé germés ou non germés.	117
Graphe 21.: évaluation par le test à la LDH de la viabilité des cellules pulmonaires exposées 24h à différentes concentrations en extraits de blé traités par le procédé Oxygreen® et germés ou non.....	118
Graphe 22.: comparaison de la quantité d'adduits à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées 24 heures aux extraits de blé pré-germés et traités ou non par le procédé Oxygreen®.....	121
Graphe 23.: concentration plasmatique en OTA, exprimé en ng/ml, chez les rats femelles.	127
Graphe 24.: concentration plasmatique en OTA, exprimé en ng/ml chez les rats mâles des différents groupes.....	127
Graphe 25.: Evolution de la concentration plasmatique en OTA, en ng/ml, en fonction de la dose d'exposition des rats mâles et femelles, en ng/kg pc/jour.....	128
Graphe 26.: concentration en OTA dans les différents organes : poumons, cerveau, foie et rein, exprimée en ng d'OTA/g d'organe, en fonction du niveau d'exposition des rats femelles à l'OTA.	129
Graphe 27.: concentration en OTA dans les différents organes : poumons, testicules, cerveau, foie et rein, exprimé en ng d'OTA/g d'organe, en fonction du niveau d'exposition des rats mâles à l'OTA.....	129
Graphe 28.: évolution de la concentration moyenne en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats femelles en fonction de l'exposition des animaux, exprimé en µg/kg pc/jour).....	130
Graphe 29.: évolution de la concentration moyenne en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats mâles en fonction de l'exposition des animaux, exprimé en µg/kg pc/jour).....	130
Graphe 30.: identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le foie des rats femelles. ..	133
Graphe 31.: identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le foie des rats mâles.	134
Graphe 32.: identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le rein des rats femelles. ..	135
Graphe 33.: identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le rein des rats mâles.	135
Graphe 34.quantité d'OTA, en µg, excrétée par la voie urinaire par les rats femelles.....	136
Graphe 35.quantité d'OTA, en µg, excrétée par la voie urinaire par les mâles.....	137
Graphe 36.: quantité, déterminée en fonction de la surface du pic à l'HPLC, des différents métabolites présents dans les urines des rats femelles de la semaine 4.	138
Graphe 37.: quantité, déterminée en fonction de la surface du pic à l'HPLC, des différents métabolites présents dans les urines des rats mâles de la semaine 4.....	139
Graphe 38.: gain de poids au cours des 28 jours de traitement chez les rats femelles exprimé en gramme.....	141
Graphe 39.: gain de poids au cours des 28 jours de traitement chez les rats mâles.	141
Graphe 40.: poids relatif des reins des rats femelles exprimé en % par rapport au poids corporel total.....	142
Graphe 41.: poids relatif des reins des rats mâles exprimé en % par rapport au poids corporel total.....	142
Graphe 42.: poids relatif du foie des rats femelles en % par rapport au poids corporel total.....	142
Graphe 43.: poids relatif du foie des rats mâles en % par rapport au poids corporel total.....	143
Graphe 44.: Poids relatif du thymus, exprimé en % massique du poids corporel total, chez les rats femelles.	143
Graphe 45.: Poids relatif du thymus, exprimé en % massique du poids corporel total, chez les rats mâles.	143
Graphe 46.: concentration en leucocytes dans le sang des rats femelles des différents groupes, exprimé en g/l de sang.	145
Graphe 47.: concentration en leucocytes dans le sang des rats mâles des différents groupes, exprimé en g/l de sang.	145

Graphe 48. : concentration sanguine en érythrocytes chez les rats femelles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.	146
Graphe 49. : concentration sanguine en érythrocytes chez les rats mâles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.	146
Graphe 50. : concentration plaquettaire dans le sang de rats femelles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.	147
Graphe 51. : concentration plaquettaire dans le sang de rats mâles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.	147
Graphe 52. : Concentration en fibrinogène, en g/l, dans le sang des rats femelles	147
Graphe 53. : Concentration en fibrinogène, en g/l, dans le sang des rats mâles	147
Graphe 54. : concentration en Cl^- , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats femelles des différents groupes.	149
Graphe 55. : concentration en Cl^- , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats mâles des différents groupes.	149
Graphe 56. : concentration en Na^+ , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats femelles.....	149
Graphe 57.: concentration en Na^+ , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats mâles	149
Graphe 58. : concentration en K^+ , en mmol/l, dans le sang des rats femelles	150
Graphe 59. : concentration en K^+ , en mmol/l, dans le sang des rats mâles.....	150
Graphe 60. : concentration en Ca^{2+} , en mmol/l, dans le sang des rats femelles des différents groupes.	151
Graphe 61. : concentration en Ca^{2+} , en mmol/l, dans le sang des rats mâles des différents groupes.	151
Graphe 62. : concentration en phosphore inorganique, en mmol/l, dans le sang des rats femelles des différents groupes.....	152
Graphe 63. : concentration en phosphore inorganique, en mmol/l, dans le sang des rats mâles des différents groupes...152	152
Graphe 64. : concentration en cholestérol, en mmol/l, dans le sang des rats femelles	153
Graphe 65. : concentration en cholestérol, en mmol/l, dans le sang des rats mâles	153
Graphe 66. : concentration en urée, en mmol/l, dans le sang des rats femelles.	153
Graphe 67. : concentration en urée, en mmol/l, dans le sang des rats mâles.....	153
Graphe 68. : concentration en créatinine, en $\mu\text{mol/l}$, dans le sang des rats femelles.....	154
Graphe 69. : concentration en créatinine, en $\mu\text{mol/l}$, dans le sang des rats mâles	154
Graphe 70. : concentration en triglycérides, en mmol/l, dans le sang des rats femelles	155
Graphe 71. : concentration en triglycérides, en mmol/l, dans le sang des rats mâles.....	155
Graphe 72. : concentration en ALP, en UI/l, dans le sang des rats femelles.....	156
Graphe 73. : concentration en ALP, en UI/l, dans le sang des rats mâles	156
Graphe 74. : concentration en ASAT, en UI/l, dans le sang des rats femelles	156
Graphe 75. : concentration en ASAT, en UI/l, dans le sang des rats mâles.....	156
Graphe 76. : concentration en ALAT, en UI/l, dans le sang des rats femelles	157
Graphe 77. : concentration en ALAT, en UI/l, dans le sang des rats mâles.....	157
Graphe 78. : quantification des différents adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats femelles des différents groupes.	158
Graphe 79. : quantification des différents adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats mâles des différents groupes.	159
Graphe 80. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats femelles ..161	161
Graphe 81. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats mâles161	161
Graphe 82. : quantification des adduits présents sur l'ADN hépatique des différents groupes de rats femelles, en nombre d'adduits par 10^9 nucléotides.	162
Graphe 83. : quantification des adduits présents sur l'ADN hépatique des différents groupes de rats mâles, en nombre d'adduits par 10^9 nucléotides.	162
Graphe 84. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le foie des rats femelles (graphe 84, représentation en boîtes à moustache ; graphe 84', présentation des valeurs individuelles).	163
Graphe 85. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le foie des rats mâles (graphe 85, représentation en boîtes à moustache ; graphe 85', présentation des valeurs individuelles).	164
Graphe 86. : concentration en OTA, exprimée en ng/ml, dans le sérum des rats femelles, recevant un blé traité (cadre extérieur vert), ou non par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur noir).	173
Graphe 87. : concentration en OTA, exprimée en ng/ml, dans le sérum des rats mâles, recevant un blé traité (cadre extérieur vert), ou non par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur noir).	173
Graphe 88. : évolution de la concentration sérique en OTA, exprimée en ng/ml, en fonction du niveau d'exposition des rats femelles, exprimé en $\mu\text{g/kg pc/jour}$	173

Graphe 89. : Concentration en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).....	174
Graphe 90. : Concentration en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).....	175
Graphe 91. : Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans le foie des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).	175
Graphe 92. : Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans le foie des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).	176
Graphe 93. : Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans les reins des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).	177
Graphe 94. : Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans les reins des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).	178
Graphe 95. : excrétion urinaire d'OTA, exprimée en µg, dans les urines des rats mâles (boîtes pleines) et femelles (boîtes hachurées) recevant un blé traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert) ou non traité (cadre extérieur noir).....	179
Graphe 96. : quantité relative en métabolites de l'OTA détectés dans les urines des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (histogrammes verts) ou non traité par Oxygreen® (histogrammes gris).....	180
Graphe 97. : quantité relative en métabolites de l'OTA détectés dans les urines des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (histogrammes verts) ou non traité par Oxygreen® (histogrammes gris).....	181
Graphe 98. : gain de poids, exprimé en g, des rats femelles recevant un blé traité par Oxygreen® (cadre vert) ou non (cadre extérieur noir) au cours des 28 jours de traitement.	185
Graphe 99. : gain de poids, exprimé en g, des rats mâles recevant un blé traité par Oxygreen® (cadre vert) ou non (cadre extérieur noir) au cours des 28 jours de traitement.	185
Graphe 100. : poids relatif des reins exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	186
Graphe 101. : poids relatif des reins exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	186
Graphe 102. : poids relatif du foie exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	187
Graphe 103. : poids relatif du foie exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	187
Graphe 104. : poids relatif du thymus exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	188
Graphe 105. : poids relatif du thymus exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	188
Graphe 106. : taux de leucocytes sanguin, exprimé en T/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	189
Graphe 107. : taux de leucocytes sanguin, exprimé en T/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	189
Graphe 108. : taux d'érythrocytes, exprimé en T/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	190
Graphe 109. : taux d'érythrocytes, exprimé en T/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	190
Graphe 110. : taux plaquettaire sanguin, exprimé en T/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	191
Graphe 111. :taux plaquettaire sanguin, exprimé en T/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	191
Graphe 112. : Concentration sanguine en fibrinogène, exprimée en g/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.....	192
Graphe 113. : Concentration sanguine en fibrinogène, exprimée en g/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.....	192
Graphe 114. : Concentration sanguine en Cl ⁻ , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.....	193
Graphe 115. : Concentration sanguine en Cl ⁻ , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.....	193

Graphe 116. : Concentration sanguine en Na^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	194
Graphe 117. : Concentration sanguine en Na^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	194
Graphe 118. : Concentration sanguine en K^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	195
Graphe 119. : Concentration sanguine en K^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	195
Graphe 120. : Concentration sanguine en Ca^{2+} , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	196
Graphe 121. : Concentration sanguine en Ca^{2+} , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	196
Graphe 122. : Concentration sanguine en phosphore inorganique, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	197
Graphe 123. : Concentration sanguine en phosphore inorganique, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	197
Graphe 124. : Concentration sanguine en cholestérol, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	198
Graphe 125. : Concentration sanguine en cholestérol, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	198
Graphe 126. : Concentration sanguine en urée, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	199
Graphe 127. : Concentration sanguine en urée, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	199
Graphe 128. : Concentration sanguine en créatinine, exprimée en $\mu\text{mol/l}$, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	200
Graphe 129. : Concentration sanguine en créatinine, exprimée en $\mu\text{mol/l}$, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	200
Graphe 130. : Concentration sanguine en triglycérides, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	200
Graphe 131. : Concentration sanguine en triglycérides, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	201
Graphe 132. : Concentration sanguine en ASAT, exprimée en UI/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	201
Graphe 133. : Concentration sanguine en ASAT, exprimée en UI/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.	201
Graphe 134. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats femelles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).	203
Graphe 135. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats mâles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).	203
Graphe 136. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le foie des rats femelles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).	204
Graphe 137. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le foie des rats mâles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).	204

Liste des publications et communications

Publications

1. Canadas D, Dubois M, Coste C & Pfohl-Leszkowicz A (2005) Oxygreen® process applied on wheat can reduce Ochratoxin A contamination, Proceeding of 7th World Congress of Chemical engineering, SECC-Glasgow-Scotland, <http://127.0.0.1:103/cgi-bin/somslid.exe?>
2. Canadas D., Dubois Michel, Coste Christian & Pfohl-Leszkowicz Annie (2005) Décontamination du blé en ochratoxine A par le procédé Oxygreen® ; étude toxicologique, Récents progrès en génie des procédés, N° 92, Lavoisier, Paris (sous presse).
3. Canadas D., Dubois Michel, Coste Christian & Pfohl-Leszkowicz Annie (2005) Interest of wheat ozonation by Oxygreen® process for mycotoxin decontamination: example of Ochratoxin A. Proceeding of Euro-Magreb Symposium on biological, Chemical Contaminant and safety on Food, Fez, Maroc.
4. Canadas D., Dubois Michel, Coste Christian & Pfohl-Leszkowicz Annie (2006) Biochemical, haematological and genotoxicity changes induced by low dose of Ochratoxin A in feed of rats. Molecular Nutrition Food research (en révision).
5. Canadas D., Dubois Michel, Coste Christian & Pfohl-Leszkowicz Annie (2006) Detoxification of ochratoxin contaminated wheat by the Oxygreen ozonation process. Molecular Nutrition Food research (en révision).

Communications orales

- Communication à la Gordon Conference 'Mycotoxine & Phycotoxine', 16-24 Juin 2005, Watterville, Maine, USA
- Communication au "World Congress of Chemical Engineering", WCCE (Glasgow, 10-14 juillet 2005)
- Communication orale au Symposium Euro-Maghrébin sur les mycotoxines (Fez, 7-9 Septembre 2005)
- Communication au congrès de la Société Française de Génie des Procédés, SFGP (Toulouse, 20-22 Septembre 2005)

Les consommateurs, tributaires jusqu'aux années 1950 de la seule production alimentaire, expriment désormais de nouvelles attentes, complexes et variées (sécurité, diversité, plaisir, santé, facilité d'usage, prix...). Les situations de crises récentes (dioxine, vache folle..) dues à une sur-médiatisation ont résulté en une "diabolisation" de l'alimentation.

En effet, face à ces risques alimentaires et à l'émergence d'un sentiment d'insécurité, les consommateurs sont de plus en plus demandeurs de produits sains dont la qualité et la sécurité alimentaire sont garanties. Il convient de prendre du recul, et de bien faire la distinction entre la présence d'une substance potentiellement toxique dans l'aliment et le risque réel.

L'objet de cette thèse s'intègre dans cette problématique de qualité et de sécurité alimentaire en se focalisant sur la contamination des céréales par les toxines de moisissures : les mycotoxines, contaminant biologique à l'origine du développement de maladies chez l'homme et l'animal.

Un aliment est considéré comme sain si celui-ci répond aux critères suivants :

présenter un intérêt nutritionnel

être exempt de danger pour la santé humaine et animale

Le blé, céréale la plus consommée par l'homme que ce soit sous forme brute ou transformée, est un aliment sain dans la mesure où il présente un intérêt nutritionnel particulier. En effet, celui-ci est riche en protéines et en glucides tout en contribuant à un faible apport lipidique. De plus, il est riche en sels minéraux, en acides aminés essentiels et en vitamines. Ces divers micro-éléments sont concentrés dans les parties périphériques du grain de blé et sont de ce fait retrouvés principalement dans les aliments complets tels que le pain et les pâtes complètes.

Une limite à cet intérêt nutritionnel réside dans le fait que les parties périphériques du grain de blé, éliminées lors de l'obtention de farines blanches, concentrent également divers contaminants d'origine biologique (micro-organismes, mycotoxines) ou chimiques (pesticides, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, métaux lourds) pouvant présenter un risque pour la santé humaine.

Le but de notre travail était de déterminer si le procédé Oxygreen®, qui consiste en un traitement du blé par l'ozone, pouvait être une réponse à ce paradoxe entre nutrition et santé. Nous avons cherché à voir si l'ozonation du blé permet l'élimination des contaminants, et plus particulièrement celle d'une mycotoxine, sans altérer les propriétés nutritionnelles du blé.

Il s'agit, au cours de cette étude, d'évaluer l'innocuité du procédé Oxygreen®, quand celui-ci est appliqué dans un but de décontamination du blé en Ochratoxine A, mycotoxine contaminant fréquemment les céréales. Le choix s'est porté sur la décontamination du blé car c'est un aliment de base de l'alimentation humaine et animale et qu'il contribue à 50% à l'exposition de l'homme à cette mycotoxine.

Dans la première partie de la revue bibliographique, nous évoquerons les caractéristiques chimiques et biologiques du blé, caractéristiques qui doivent être prises en compte lors du traitement du blé par le procédé Oxygreen®. Nous exposerons les standards de qualité, définis au niveau Européen, auxquels il est nécessaire de se référer afin de développer un produit conforme à la demande et ayant des acquéreurs potentiels sur le marché national et international. Par la suite, nous présenterons l'Ochratoxine A (OTA), mycotoxine pour laquelle le potentiel décontaminant du procédé sera évalué. Nous aborderons plus particulièrement les risques qui peuvent être liés à l'ingestion de l'OTA, et décrirons les voies conduisant à l'exposition humaine à cette toxine. Comme nous le verrons, cette mycotoxine n'est pas détruite au cours des procédés de transformation agro-alimentaires, et peu de solutions efficaces sont développées pour limiter la survenue des contaminations ou décontaminer les produits finis.

Le procédé, qui consiste à appliquer un flux d'ozone sur le blé contaminé, peut être une solution à ce problème. L'ozone a des propriétés bactéricides qui sont déjà exploitées dans le domaine alimentaire. Nous présenterons les propriétés de l'ozone, et nous définirons les paramètres d'ozonation utilisés dans le cadre du procédé Oxygreen®. Après cette introduction générale, ayant pour objet de situer le sujet dans la problématique actuelle, nous développons les techniques utilisées ayant permis l'obtention des résultats décrits en dernière partie.

Nous avons testé le potentiel décontaminant de l'ozone quand celui-ci est appliqué sur une solution pure de mycotoxine, ou dans le cadre du procédé Oxygreen®, quand celui-ci est appliqué sur

du blé contaminé en OTA. Afin de pouvoir évaluer la toxicité résiduelle, nous avons tout d'abord étudié les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à l'OTA. Cela nous a permis de confirmer la différence de susceptibilité entre mâle et femelle. L'innocuité du procédé a été testée sur deux modèles : *in vitro* et *in vivo*. L'étude *in vitro* nous a permis de mettre en évidence l'importance que revêt la qualité du blé vis-à-vis de l'innocuité du procédé. L'étude *in vivo* a été réalisée chez des rats de la race Dark Agouty recevant les lots de blés contaminés en OTA et traités ou non par le procédé Oxygreen®. Nous verrons que selon la relation effet-dose observée, la diminution de l'exposition réduit proportionnellement ou non l'effet toxique.

En conclusion de ce travail, nous évoquerons les domaines qui pourront être envisagés pour l'utilisation de ce procédé, ainsi que les optimisations qui devront être apportées. Les résultats de l'étude de l'exposition sub-chronique à l'OTA seront discutés, ceux-ci ayant mis en évidence l'apparition d'effets toxiques pour des doses d'exposition modérées qui jusqu'à présent avaient été considérées comme inférieures à la dose seuil d'effet.

Introduction bibliographique

1. Le Blé, caractéristiques, aspects nutritionnels et normes de qualité

1.1 Le blé, description et caractéristiques

Actuellement, le blé est la céréale la plus produite et la plus consommée en Europe. Il existe aujourd'hui plus de 20000 variétés de blé au niveau mondial, variétés adaptées à différents milieux, et développant une résistance envers certains pathogènes et maladies du blé. Au niveau mondial, la production de blé arrive en seconde place, après le maïs.

1.1.1 Eléments de botanique et morphologie

Le blé est une plante herbacée monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des graminées. Les deux espèces qui dominent sont le blé tendre et le blé dur. Ce fruit sec est constitué d'une graine unique intimement soudée à l'enveloppe du fruit qui la contient. Sur l'épi, le grain est entouré d'enveloppes qui n'adhèrent pas à la graine et qui sont éliminées au moment du battage. La structure du grain de blé est présentée ci-dessous.

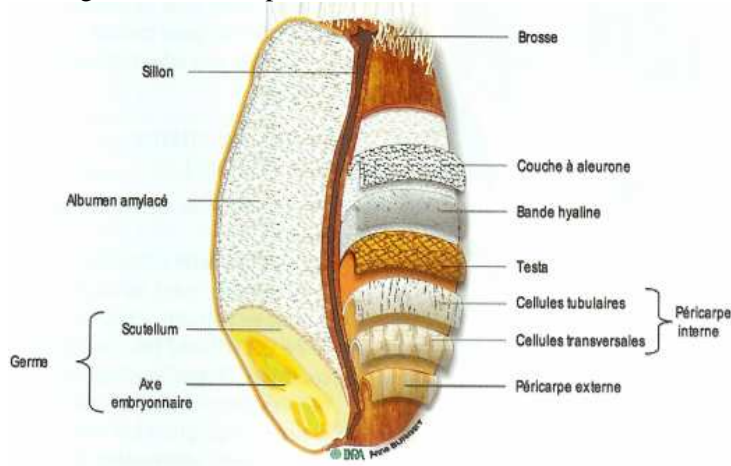


Figure 1. : Structure du grain de blé (d'après Surget & Barron, 2005)

D'un point de vue morphologique, le grain de blé a une forme ovoïde et présente sur la face ventrale un sillon qui s'étend sur toute la longueur. A la base dorsale du grain, se trouve le germe qui est surmonté par une brosse. Le grain de blé mesure entre 5 et 7 mm de long, et entre 2,5 et 3,5 mm d'épaisseur, pour un poids compris entre 20 et 50 mg. Le grain est constitué de différentes couches ; ainsi, de la surface externe vers le centre du grain, on trouvera l'enveloppe du fruit ou péricarpe, puis l'enveloppe de la graine ou testa, et enfin, à l'intérieur de la graine, la bande hyaline, l'albumen et le germe.

1.1.2 Composition des différents tissus du blé (Surget & Baron, 2005)

Chacun des tissus du blé a une composition qui lui est propre.

Le péricarpe est divisé en deux composantes : le péricarpe interne et le péricarpe externe. Ce dernier est constitué majoritairement de cellulose, d'hémicellulose (pentosanes) et de lignine. Le péricarpe interne est formé de trois couches cellulaires, les cellules intermédiaires, les cellules transversales et les cellules tubulaires ou endocarpe.

La testa, enveloppe de la graine, est constituée de deux couches cellulaires, et contient majoritairement les pigments et des composés lipidiques.

L'albumen est constitué de deux tissus bien distincts : la couche à aleurone et l'albumen amylicé plus interne. La couche à aleurone, riche en protéines et en lipides, renferme en outre d'importantes quantités de micronutriments (minéraux, vitamines et antioxydants). L'albumen amylicé est constitué d'amidon enchassé au sein d'une matrice protéique plus ou moins dense. L'essentiel de l'albumen amylicé se retrouve dans les farines et semoules après mouture du grain.

Enfin, le germe constitue l'ébauche de la future plante. Celui-ci est riche en protéines, en lipides et contient également des minéraux et des vitamines.

La composition moyenne en protéines, en glucides, en lipides et en éléments minéraux du grain de blé, dans son ensemble, est telle que décrite dans le tableau 1.

Nature du composant	Teneur en % de la matière sèche
Protéines	10-15
Amidon	67-71
Pentosanes	8-10
Cellulose	2-4
Sucre libre	2-3
Lipides	2-3
Matières minérales	1,5-2,5

tableau 1. : Composition du blé en divers éléments exprimé en % sur la matière sèche. D'après Feillet, 2000

1.1.3 La couche à aleurone, un tissu particulier du blé

La couche à aleurone est la couche histologique située à la périphérie de la graine, entre l'albumen amylicé et les enveloppes (pour une revue, Antoine *et al*, 2002). Elle est, avec l'embryon, l'unique tissu vivant dans la graine mature, et permet son développement au cours de la germination. Cette couche assure deux fonctions : la première est une fonction de protection assurée grâce à sa structure pariétale résistante. La seconde est une fonction nourricière assurée *via* le stockage de métabolites et la synthèse d'enzymes d'hydrolyse des réserves. Cette couche renferme des quantités importantes de molécules présentant un intérêt nutritionnel. La couche à aleurone appartient, d'un point de vue histologique, à l'albumen mais est éliminée en meunerie avec les fractions d'enveloppes (sons). Celle-ci présente un intérêt nutritionnel particulier, étant riche en minéraux, en vitamines et en acides aminés essentiels.

La couche à aleurone du blé est formée d'une seule couche de cellules. Les cellules contiennent des structures sphériques, ou grains à aleurone, constitués d'inclusions de phytates, dites de type I, et d'inclusions de niacine, dites de type II. Les inclusions de type I sont formées d'acide phytique lequel chélate les minéraux bivalents comme le magnésium, le calcium, ou le fer pour former les phytates. Ceux-ci constituent une forme de réserve de phosphore et de minéraux. Au cours du processus de germination, des enzymes de type phosphatases, les phytases, vont hydrolyser les phytates, libérant le contenu minéral. Les inclusions de type II sont composées de niacine, complexe de vitamine PP et de protéines. La couche à aleurone est une importante source de thiamine (vitamine B1), de niacine (Vitamine PP) et de folates (Vitamine B9) : 100 g de couche à aleurone permettent de couvrir les besoins journaliers en ces 3 vitamines. Elle contient également des vitamines liposolubles dont la vitamine E. En outre, la couche à aleurone concentre plus de 40% des minéraux du grain. Enfin, le dernier intérêt nutritif de la couche à aleurone est lié au fait que, les protéines qui la constituent sont riches en acides aminés essentiels, notamment la lysine, peu présent dans les protéines de l'albumen amylicé.

Le tableau 2 ci-après résume les teneurs en vitamines et en minéraux de la couche à aleurone.

Elément	mg/100 g de couche à aleurone sèche
Vitamine B1	1,6
Vitamine B2	0,3
Vitamine B3	24
Vitamine B6	0,3
Vitamine B9	0,8
Vitamine E	2
Potassium	1600
Phosphate	1140
Magnésium	530
Manganèse	101
Calcium	55
Fer	27
Zinc	8,3

tableau 2. : Teneur en vitamines et en minéraux de la couche à aleurone (mg pour 100 g de couche à aleurone) d'après Lopez et al, 2001.

Ainsi, la couche à aleurone présente un intérêt nutritionnel évident. Cependant, l'accessibilité de ces micronutriments reste limitée. Au cours du processus de mouture, la couche à aleurone conserve sa structure pariétale rigide. Ces polysaccharides pariétaux (fibres), lesquels ne sont que partiellement digérés par les enzymes de la digestion, constituent une barrière à la libération des vitamines et des minéraux. En outre, la présence des phytates, chélateurs des sels minéraux, limite la biodisponibilité des nutriments.

Le développement de procédés permettant d'augmenter l'accessibilité à ces micronutriments présente un intérêt : ceux-ci permettent d'enrichir directement les farines en ces éléments ou, de les purifier, afin de les réintroduire à la demande dans la chaîne de transformation du blé. Le procédé Oxygreen® a pour effet de faciliter la digestibilité des parties périphériques du grain de blé.

1.2. Les critères de qualité du blé

1.2.1 Les critères de qualité du blé au niveau mondial

La norme CODEX STAN A99-1995 définit les critères de qualité pour le blé tendre *Triticum aestivum* L. et pour le blé dur, *Triticum durum*. Ces critères de qualité sont des critères visant à garantir la sécurité alimentaire, et concernent également des critères technologiques, gustatifs et olfactifs. Les teneurs maximales autorisées, en divers contaminants tels que des céréales autres que le blé ou des matières organiques et inorganiques étrangères, dans le blé sont présentées ci-après.

éléments	définition	Taux maximal autorisé
- Eau		14,5% m/m
- <i>Sclerotium du champignon Claviceps purpurea</i>		0,05% m/m
- graines crotalaires, nielles de blé, stamaines et autres variétés de graines généralement reconnues comme dangereuses pour la santé - métaux lourds - résidus de pesticides		0 ou teneur n'ayant pas d'impact sur la santé
- Souillures	Impuretés d'origine animale	0,1 % m/m
- Matières organiques étrangères	Substances de type organique différentes des graines comestibles des céréales	1,5 % m/m
- Matières étrangères inorganiques	Pierres, poussières	0,5% m/m

tableau 3. : Critères de qualité du blé tendre et du blé dur au niveau mondial. D'après norme CODEX 199-1995

Les produits dérivés du blé sont également soumis à des critères de qualités qui ne seront pas décrits en détail ici. La norme CODEX STAN 152-1985 s'applique à la farine de blé tendre, non complète, et destinée à l'alimentation humaine telle quelle, ou, destinée à l'utilisation pour la confection d'autres produits alimentaires. De même, la norme CODEX STAN 178-1991 fixe les critères de qualités applicables sur la farine de blé dur et la semoule de blé dur. Elle s'applique aux semoules de blé, y compris la semoule complète, ainsi qu'à la farine de blé dur, destinées à l'alimentation humaine sous forme emballée et prête à la vente, ou destinées à l'emploi dans d'autres préparations alimentaires. Enfin, la norme CODEX STAN 163-1987 concerne les produits à base de protéines de blé (PPB) incluant le gluten de blé.

Ainsi, il apparaît que les critères de qualité du blé, définis par les normes CODEX, tiennent compte des contaminations en pesticides, champignons, ou mycotoxines du blé. L'utilisation d'un procédé permettant l'élimination de ces contaminants, tout en respectant les propriétés gustatives et technologiques ainsi que les autres critères de qualité, permettra d'accroître la qualité du blé selon des critères reconnus au niveau mondial, et permettra l'obtention d'un blé compétitif sur le marché international.

1.2.2 Les standards de qualité en Europe

Les standards de qualité du blé en Europe sont définis dans l'annexe 1 du règlement CE N° 824/2000 de la commission du 19 Avril 2000. Ces critères sont rappelés dans le tableau 4.

Type de blé	Blé dur	Blé tendre
<i>A. Teneur maximale en humidité</i>	14,5%	14,5%
<i>B. Pourcentage maximal d'éléments qui ne sont pas des céréales de base de qualité irréprochable dont au maximum :</i>	12%	12%
- grains brisés	6%	5%
- impuretés constituées par des grains	5%	7%
- grains échaudés	-	-
- autres céréales	3%	-
- grains attaqués par des prédateurs	-	-
- grains présentant une coloration du germe	-	-
- grains chauffés par séchage	0,5%	0,5%
- grains mouchetés et/ou fusariés	5%	-
- grains germés	4%	4%
- impuretés diverses	3%	3%
- graines étrangères	-	-
- nuisibles	0,1%	0,1%
- grains avariés	-	-
- grains détériorés par chauffage et séchage brutal	0,05%	0,05%
- ergot	0,05%	0,05%
- insectes morts et fragments d'insectes	-	-
<i>C. Pourcentage maximal de grains mitadinés, même partiellement</i>	27%	-
<i>D. Teneur maximale en tanin</i>	-	-
<i>E. Poids spécifique minimal (kg/hl)</i>	78	73
<i>F. Taux minimal de protéines :</i>	-	-
- Campagne 2000-2001	11,5%	10%
- Campagne 2001-2002	11,5%	10,3%
- Campagne 2002-2003 et suivantes	11,5%	10,5%
<i>G. Temps minimal de chutes en secondes (Hagberg)</i>	220	220
<i>H. Indice minimal de Zélény (ml)</i>	-	22

tableau 4. : Critères Européens de qualité sur le blé dur et le blé tendre

Ces standards de qualité vont permettre de déterminer la valeur commerciale d'un lot de blé. Le blé mis sur le marché, doit être « de qualité saine, loyale et marchande » et doit pour cela répondre aux critères de qualité énumérés dans le tableau 8. Des pénalités sur le prix de vente du blé seront appliquées, en considérant les valeurs obtenues pour ces différents critères.

1.3 La transformation du blé dans les procédés agro-alimentaires

1.3.1 Méthode de transformation du blé

Les principales formes d'utilisation du blé sont la farine pour le blé tendre, et la semoule pour le blé dur. Les différentes filières pour la valorisation et l'exploitation du blé sont présentées sur la figure 2.

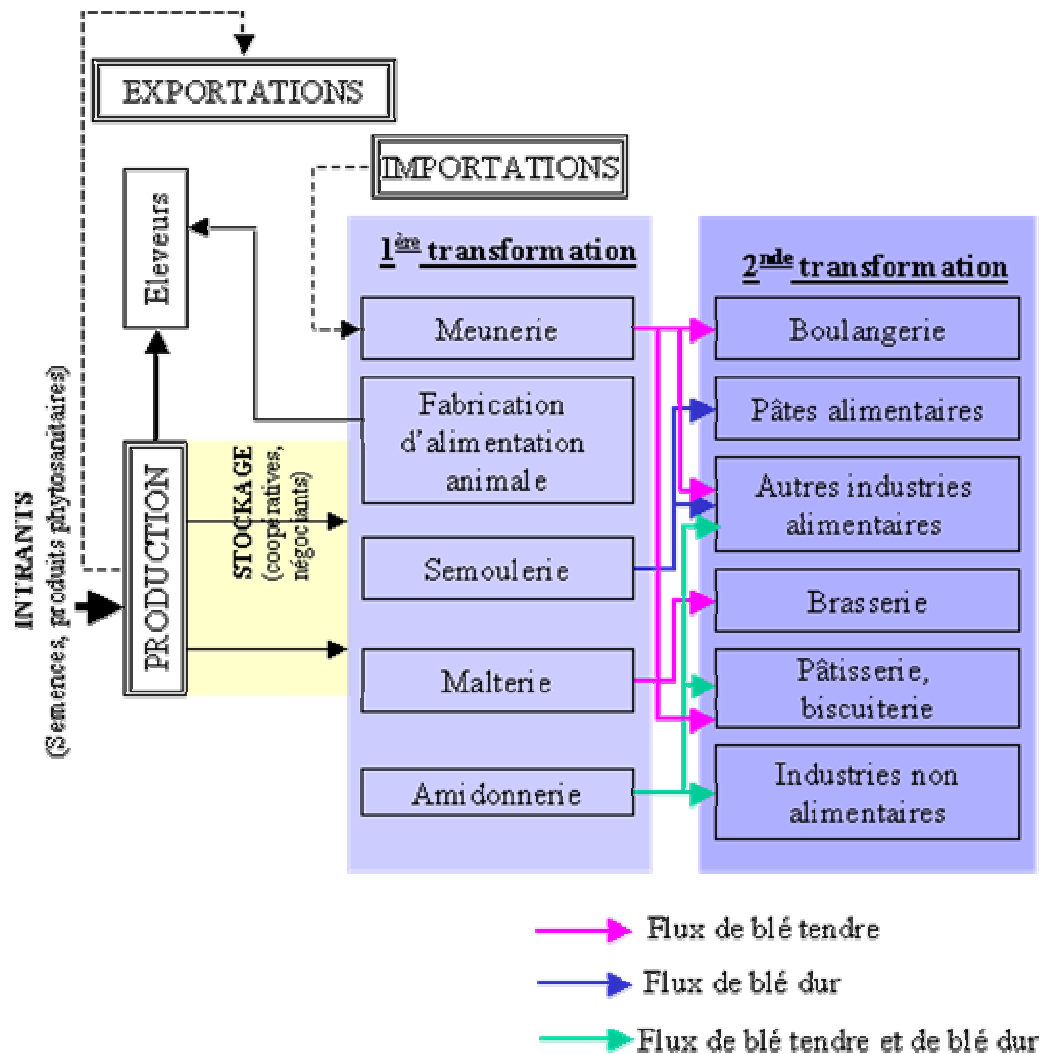


Figure 2. Filière de transformation française du blé d'après le document du conseil national de l'alimentation, Céréaliers français, « présentation de la filière céréalière française ».

Une part du blé produit sera destinée à l'exportation, l'alimentation animale et à la première transformation (Meunerie, semoulerie...). En seconde transformation, le blé est utilisé en boulangeries, pâtisseries ainsi que dans d'autres industries alimentaires et non-alimentaires.

Le procédé de première transformation du blé comporte plusieurs étapes. La cargaison de blé produite sera déchargée au niveau des silos de stockage, pour les cas où celle-ci répond au cahier des

charges évoqué précédemment. La mise en silo sera effectuée après nettoyage et dépoussiérage des grains. Au cours d'une seconde phase de nettoyage du blé, juste avant la mouture, les métaux, pierres, roches, graines et pailles sont éliminées. Une fois ces opérations terminées, le blé est humidifié (conditionnement) pour atteindre un taux final d'humidité compris entre 16 et 18%. Le blé est alors prêt pour la transformation, par mouture, en farine ou en semoule. Le principe de la mouture consiste à passer le blé successivement dans des broyeurs ayant des caractéristiques différentes. Les grains passent entre deux cylindres cannelés tournant en sens inverse et à des vitesses différentes. Plus on descend dans la ligne de broyage, plus les cannelures des cylindres deviennent fines et rapprochées, cette opération permettant de séparer l'enveloppe de l'amande. Des broyeurs à cylindres lisses permettent d'obtenir les produits les plus fins (farines). La séparation et la purification des produits obtenus sont réalisées par un système de tamis de maillage de plus en plus petit.

Les étapes du procédé de mouture ne doivent pas être fondamentalement modifiées ou gênées suite à l'application de nouveaux traitements sur le blé, tels que ceux visant à l'amélioration de la qualité sanitaire du blé.

1.3.2 Les secteurs d'utilisation du blé

Le blé peut trouver quelques applications dans des domaines non alimentaires comme celui de la cosmétique, ou de l'amidonnerie (fournissant des papiers peints, bioéthanol, enrobages d'engrais...), cependant le principal débouché est l'alimentation humaine et animale.

1.3.2.1 Utilisation du blé en alimentation humaine

Dans l'alimentation humaine, la principale voie de transformation de la farine de blé tendre est la fabrication du pain. La composition traditionnelle du pain est de 100g de farine de blé tendre, 60 g d'eau, 1,8 à 2,2 g de sel et enfin, 1 à 2% de levure. La composition de la pâte à pain pourra varier autour de cette recette standard en y ajoutant du sucre, du beurre et de la poudre de lait pour l'obtention de pain viennois ou de pain de mie, ainsi que des additifs ayant pour objectif de conférer des propriétés particulières à la farine et au pain. Le procédé de fabrication du pain comprend 4 principales étapes qui sont respectivement le pétrissage, le façonnage, la fermentation au cours de laquelle la pâte doit tripler de volume, et enfin, la cuisson.

La farine obtenue à partir de blé tendre doit avoir des caractéristiques telles que celle-ci soit panifiable, et que le produit fini ait des caractéristiques visuelles et gustatives conformes à ce attendu. Le pain obtenu sera noté selon 3 grandes familles de critères qui concernent la pâte, la mie et le pain fini.

La principale utilisation du blé dur concerne la fabrication des pâtes alimentaires, qui pourront être fraîches, semi-fraîches ou sèches. Pour la confection des pâtes, la semoule de blé dur est mélangée à de l'eau et du sel. Les étapes de mélange, d'extrusion ainsi que de séchage permettent d'achever la transformation de la semoule de blé dur en pâtes sèches.

1.3.2.2 Utilisation du blé en alimentation animale

Le blé, outre ses applications en alimentation humaine, est largement utilisé en alimentation animale. L'utilisation du blé en alimentation animale est prédominante dans les pays industrialisés.

L'utilisation du blé en alimentation animale permet la valorisation de sous-produits tels que les sons et remoulages, non utilisés en alimentation humaine. Les sons, remoulages et « farines basses » représentent 1,5 millions de tonnes en France. Leur intérêt dans l'alimentation animale, consommés sous forme de poudres ou granules, est lié au fait qu'ils contiennent des vitamines, protéines et minéraux en quantités intéressantes (cf paragraphe 1.1.1.3). D'un point de vue protéique, les sons et remoulages ont une valeur biologique supérieure à celle du gluten, la valeur biologique des protéines étant déterminée par leur richesse en acides aminés essentiels. Le blé, bien que pauvre en lipides, contient des acides gras de types oméga 6 et 3, intéressants d'un point de vue nutritif, et concentrés dans le germe et les couches périphériques, parties éliminées avec le son.

1.4 La consommation de blé : un paradoxe entre nutrition et sécurité

Le programme National de Nutrition et de Santé, lancé en 2001, a pour objectif d'améliorer la santé de la population en jouant sur la nutrition. Le rapport du Haut comité de Santé publique sur l'alimentation des français, en 2000, a mis en évidence une carence de la population en glucides complexes, des déficiences nutritionnelles en protéines végétales, des déficiences en de nombreux minéraux, oligo-éléments et vitamines ainsi qu'une carence en fibres.

La consommation de céréales, et en particulier de blé, s'accorde avec ces objectifs nutritionnels, celles-ci étant une source de glucides complexes dont les fibres, de protéines végétales, vitamines et minéraux, tout en contribuant à un faible apport lipidique. Cependant, afin de répondre à ces objectifs nutritionnels, il est nécessaire d'augmenter la consommation en parties périphériques du grain, source privilégiée de fibres et de minéraux.

La mouture consiste à extraire le maximum d'albumen amylicé sans qu'il y ait « contamination » par les parties périphériques du grain. D'une façon générale, les farines ont une teneur en cendre inférieure à 0,6%, permettant à la fois de garantir une bonne valeur technologique de celles-ci mais également d'offrir des propriétés organoleptiques appréciées des consommateurs. Les aliments céréaliers obtenus à partir de ces farines ont en revanche une faible densité nutritionnelle en micronutriments. Des farines, ayant un taux d'extraction plus élevé, sont commercialisées. Leur teneur en cendre est comprise entre 0,85% et 1,5% : ce sont les farines de type complètes, dont la valeur nutritionnelle est plus élevée. Cependant, elles présentent l'inconvénient de moins bien réagir au procédé de panification, conférant un faible volume aux pains. Ces farines complètes, riches en parties périphériques du grain, ont des propriétés nutritionnelles attrayantes. Cependant, le paradoxe réside dans le fait que l'extraction des parties périphériques du grain contribue à l'augmentation de la valeur nutritionnelle mais également à l'augmentation de la contamination par des substances chimiques et biologiques présentes à la surface du grain.

2. Un contaminant biologique du blé : l'Ochratoxine A

2.1 Présentation de l'ochratoxine A

2.1.1 Définition et origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, c'est-à-dire que celles-ci sont produites par le champignon de façon non nécessaire à son développement. Celles-ci peuvent présenter une diversité structurale importante et leur structure chimique est souvent complexe (Sire *et al.*, 1989 ; Betina, 1994 ; Steyn, 1995). Il est souvent difficile de leur attribuer un rôle physiologique direct, cependant, certaines fonctions leur ont été attribuées dans le métabolisme des microorganismes, comme la détoxification des substances accumulées au cours du métabolisme primaire, l'intervention dans les processus de différenciation cellulaire, ou la réponse aux conditions environnementales (Luckner, 1984). Cinq genres de champignons, dits toxigènes, ont la capacité de produire des mycotoxines ; il s'agit des genres *Claviceps*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* (Miller & Trenholm, 1994). Ces moisissures et leurs mycotoxines associées, sont susceptibles de contaminer l'aliment tout au long de la chaîne de production, du champ à l'assiette du consommateur. Les champignons toxigènes peuvent être divisés en 4 groupes en fonction du moment où ceux-ci se développent sur l'aliment. On distinguera ainsi les pathogènes de la plante, les champignons poussant et produisant des mycotoxines sur des plantes sénescents et stressées, les champignons colonisant la plante et prédisposant celle-ci à la contamination par les mycotoxines à la récolte, et enfin, les champignons qui proliféreront au moment du stockage des denrées (pour une revue voir Le Bars, 2002).

Parmi l'ensemble des mycotoxines qui peuvent être retrouvées sur les aliments, seulement certaines contaminent l'alimentation humaine et constituent de ce fait, un risque pour la santé. Les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone, les fumonisines, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique, et les trichotécènes. (D'Mello & Mc Donald, 1997 ; Scudamore & Livesey, 1998, Pfohl-Leskowicz, 1999a ; 2002 ; Pfohl-Leskowicz & Castegnaro, 2002 ; Bennet & Klich, 2003). Les denrées alimentaires contaminées sont les matières premières comme les fruits et les fruits secs, les céréales, mais également les produits transformés comme le pain, la farine, les pâtes ou les jus de fruits. Quelques exemples de contaminations en moisissures et mycotoxines des denrées alimentaires sont présentés dans le tableau 5.

Denrées	Espèces toxiques contaminantes	Mycotoxine probable
Blé, farine, pain, maïs, chips	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. citreoviride</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. martensii</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. pubertum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Aflatoxines, Ochratoxines, Stérigmatocystine, Acide Penicillique, Patuline
Arachides, noix	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. cyclopium</i>	Aflatoxines, Ochratoxines, Stérigmatocystine, Trichotécènes, cytochalasines, patuline
Pommes et produits dérivés	<i>Penicillium expansum</i>	Patuline
Tourte à la viande, viande cuite, fromage, cacao, houblon	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium veridicatum</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. patulum</i> , <i>P. commune</i>	Aflatoxines, Ochratoxines, Stérigmatocystine, Patuline, Acide Penicillique
Viandes, porc salé, fromage	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Penicillium veridicatum</i> , <i>P. cyclopium</i>	Aflatoxines, Ochratoxines, Stérigmatocystine, Patuline, Acide Penicillique, Penitrem
Fèves, orge, maïs, sorgho, soja	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Fusarium moliniforme</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. islandicum</i> , <i>P. urticae</i>	Aflatoxines, Ochratoxines, Stérigmatocystine, Alternariol, griséofulvine, Patuline, Acide Penicillique, Citrinine
Poivre noir, poivre rouge, pâtes	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. ochraceus</i>	Aflatoxines, ochratoxines

tableau 5. : contamination en moisissures et en mycotoxines de diverses denrées alimentaires (CAST, 1989)

Ainsi, une même denrée peut être sujette à de multiples contaminations. De plus, un champignon toxigène peut produire plusieurs mycotoxines, et des mycotoxines identiques peuvent être synthétisées par des champignons de genres et d'espèces différentes. La présence de ces champignons toxigènes sur une denrée n'est pas nécessairement le signe d'une contamination par des mycotoxines : la production de mycotoxines par le champignon aura lieu uniquement si les conditions environnementales favorables à cette contamination sont réunies. Ainsi, les paramètres environnementaux tels que le taux d'humidité, la température, la présence d'oxygène ou la composition du substrat, conditionneront le développement des moisissures et la production de mycotoxines (pour une revue, voir Ominski *et al*, 1994 ; Pfohl-Leszkowicz, 1999b, 2002 ; Le Bars, 2002).

Selon l'Organisation Mondiale de la santé, près de 25% des denrées sont contaminées par des mycotoxines, celles-ci étant responsables de pertes économiques non négligeables (Mannon & Johnson, 1985).

Parmi ces mycotoxines, l'Ochratoxine A a retenu notre attention et est présentée de façon plus détaillée ci-après.

2.1.2 Présentation de l'ochratoxine A

2.1.2.1 Caractéristiques biochimiques de l'Ochratoxine A

L'ochratoxine A, ou OTA, a été isolée pour la première fois en 1965, par un groupe de chercheurs sud-africains à partir d'un isolat d'*Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al*, 1965 a & b).

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

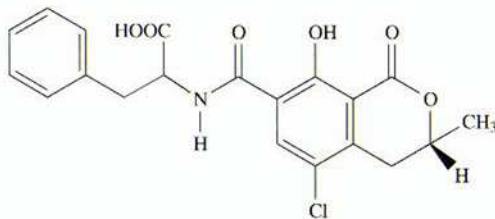


Figure 3. : structure de l'Ochratoxine A

Il existe d'autres ochratoxines comme l'ochratoxine B (OTB) qui est le dérivé non chloré de l'OTA, et l'ochratoxine C (OTC) qui est son ester éthylique. Ces différences de structure, bien que minimales, ont des effets marqués sur leur potentiel toxique respectif. L'OTA est à la fois la plus répandue et la plus toxique.

L'OTA est un solide blanc de masse molaire 403,8 g/mole, ayant un point de fusion de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. Son spectre d'absorption UV varie avec le pH et la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm, avec un coefficient d'extinction molaire de 5 500 mol⁻¹.cm⁻¹ dans le méthanol.

Les conditions de production de cette molécule sont décrites ci-après.

2.1.2.2 Production de l'OTA

L'OTA est un métabolite secondaire élaboré par diverses moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. La production d'OTA est liée aux conditions de température, d'humidité ambiante, et de teneur en eau du support contaminé (Pitt, 1987 ; pour une revue, voir Magan & Aldred, 2005). Les valeurs minimales d'humidité pour la production d'OTA oscillent entre 0,83 et 0,90, en fonction de la moisissure étudiée (Northolt *et al*, 1979). La température optimale de production de l'OTA, par *Aspergillus ochraceus*, est de 28°C, bien que la production puisse avoir lieu entre 15 et 37°C. (Trenk *et al*, 1991). Au contraire, *Penicillium viridicatum* croît dans une gamme de température qui varie de 4

à 30°C, en présence d'une humidité de 22% (Mislivec & Tuite, 1970). Dans les régions froides, l'OTA est donc plutôt produite par des *Penicillia*, alors que dans les régions chaudes, ce sont plutôt les *Aspergillii* qui la synthétisent (Pohland *et al*, 1992 ; Miller, 1995). La production d'OTA est liée à la physiologie propre à chacune des espèces et aux paramètres écologiques. En Europe et au Canada, *P. verrucosum* est considéré comme la principale moisissure productrice d'OTA dans les céréales (JECFA, 2002 ; Magan & Aldred, 2005). L'OTA se formerait préférentiellement sur les aliments plutôt acides (Cuero & Smith, 1987). Les concentrations en OTA, retrouvées dans les aliments, sont très variables et sont comprises entre quelques ng/kg jusqu'à plusieurs dizaines de mg/kg (Krogh, 1987 ; Kuiper-Goodman & Scott, 1989).

Les moisissures produisant l'OTA, peuvent également produire d'autres toxines, ou cohabiter avec d'autres moisissures produisant des toxines différentes comme la citrinine ou l'aflatoxine (Krogh *et al*, 1973, Park *et al*, 2002) . Un phénomène de synergie avec l'OTA peut donc se produire et compliquer l'analyse des effets toxiques, ceux-ci ne pouvant être exclusivement attribués à l'OTA (Kanisawa, 1984 ; pour une revue, voir Pohland *et al*, 1992 ; Pfohl-Leskowicz *et al*, 2002a ; Molinié, 2004).

La présence d'OTA dans les aliments représente un danger pour la santé humaine et animale. Les conditions d'exposition de l'homme à cette toxine, ainsi que les différents aspects toxiques liés à son ingestion, sont présentés dans le paragraphe suivant.

2.2 L'OTA un risque pour la santé humaine et animale

2.2.1 Toxicocinétique et toxicité de l'OTA

2.2.1.1 Toxicocinétique de l'OTA

2.2.1.1.1 Absorption de l'OTA et demi-vie dans le compartiment sanguin

L'OTA, une fois ingérée, est partiellement absorbée au niveau stomacal par diffusion passive de la forme non ionisée (Lillehoj *et al*, 1979 ; Galtier *et al*, 1981 ; pour une revue, voir Ringot *et al*, 2006). Cependant, ce mécanisme passif ne contribue qu'à une faible absorption de l'OTA. Le principal site d'absorption est au niveau intestinal, et plus précisément, au niveau de la partie proximale du jéjunum (Kanisawa & Suzuki, 1990). Le pourcentage d'absorption de l'OTA au niveau de l'intestin est respectivement de 66 ; 56 ; 56 et 40 % chez le porc, le rat, le lapin et le poulet (Suzuki *et al*, 1977 ; Galtier *et al*, 1979, 1981). Elle est ensuite distribuée aux différents organes *via* le système porte et le foie. Elle suit le cycle enterohépatique (Kumagai & Aibara, 1982 ; Roth *et al*, 1988 ; Fuchs *et al*, 1988b). On retrouve peu d'OTA sous forme libre dans le sang. En effet, l'OTA a une très grande affinité pour certaines protéines plasmatiques auxquelles elle est fixée à 90 % (Hagelberg *et al*, 1989). Elle se fixe sur l'albumine sérique et sur une macromolécule sérique non identifiée d'un poids moléculaire de 20 KDa. (Galtier *et al*, 1979 ; Stojkovic *et al*, 1984 ; Il'ichev *et al*, 2002a). La fixation de l'OTA à ces protéines est un phénomène saturable, avec une saturation atteinte pour des taux de quelques centaines de µg/ml (Galtier *et al*, 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 de deux sites de fixation sur l'albumine sérique (Il'ichev *et al*, 2002b). D'après ces auteurs, ces deux sites de fixation appartiennent aux sous-unités IIA et IIB de l'albumine sérique. Ils ont également montré que ces liaisons pouvaient être déplacées par différents ligands anioniques, tels que l'aspartame, la phénylalanine, et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Il'ichev *et al*, 2002a). Cette fixation retarde le transport de l'OTA vers les différents organes, augmente sa demi-vie dans le compartiment sanguin, et, contribue par conséquent au développement des effets toxiques chroniques de cette toxine. Le profil toxicocinétique de l'OTA varie beaucoup en fonction de l'espèce. La demi-vie d'élimination de l'OTA, après administration par voie orale, sera comprise entre 0,68 heures chez le poisson et 21 jours pour le singe (pour une revue, voir Størmer, 1992). Elle est estimée à 75-120 heures chez le porc, entre 55 et 230 heures chez le rat et entre 24 et 29 heures chez la souris (Størmer, 1992 ; Zepnik *et al*, 2003). Chez l'homme, la demi-vie d'élimination de l'OTA est encore plus longue, et a été estimée à un mois. En outre, l'élimination de l'OTA a été décomposée en deux phases, l'une rapide avec une demi-vie de

l'OTA dans le sang de 20 heures, et la seconde, beaucoup plus lente, où la demi-vie de l'OTA dans le sang atteint 35,5 jours (Studer-Rohr *et al*, 2000). Par la suite, l'OTA est distribuée aux organes, où elle est métabolisée en vue de son excrétion.

2.2.1.1.2 Distribution de l'OTA aux organes, métabolisation, et excrétion.

2.2.1.1.2.1 Distribution de l'OTA

La distribution tissulaire de l'OTA, en terme de concentration en ng d'OTA/g d'organe, chez le porc, le poulet ou la chèvre, suit en général l'ordre suivant : reins >foie et muscle> graisses (Madsen *et al*, 1982a ; Mortensen *et al*, 1983). La distribution de l'OTA dans les différents organes varie en fonction de l'espèce et du mode d'administration de la toxine, mais également en fonction du temps. Chez les rats de la race Wistar, l'exposition à l'OTA par intubation montre une distribution de l'OTA, 24 heures après l'exposition, principalement au niveau stomacal puis dans le foie, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau. Quarante huit heures après l'administration de l'OTA, la distribution est modifiée, les concentrations maximales en OTA étant alors présentes dans le foie, l'estomac, les poumons, les reins, le cœur et le cerveau (Kane *et al*, 1986b). Lors de l'exposition de rats à des doses journalières de 100µg/kg pc pendant onze mois, l'organe ayant les concentrations les plus élevées est le poumon puis les testicules et le foie (Faucet-Marquis, 2005).

2.2.1.1.2.2 Transport de l'OTA vers les organes

La distribution de l'OTA dans les organes dépend de son transport vers l'organe, ainsi que de son élimination. L'expression de transporteurs différents, ou d'isoformes différents de ces transporteurs en fonction du sexe, de l'espèce ou de l'organe sont la clé des différents profils de stockage qui sont observés.

Au niveau hépatique, la distribution de l'OTA va dépendre de son transport dans le foie, de sa métabolisation, de son excrétion biliaire ainsi que son passage vers le sang (Pang & Rowland, 1977 ; Pang & Gillette, 1978 ; Yamasaki *et al*, 1996 ; Shitara *et al*, 2005). Au niveau hépatique, l'entrée des xénobiotiques peut être médiée par les transporteurs des acides biliaires Na⁺ dépendants ainsi que par les OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides), sodium dépendants ou pas, et l'efflux est réalisé par des pompes ATP dépendantes comme les MOAT (Multi Organic Anion Transporter) ou les MRPs, Multidrug Resistance associated Proteins (Kontaxi *et al*, 1996 ; pour une revue, voir Kim, 2002 ; Ringot *et al*, 2005). L'entrée de l'OTA par les transporteurs Oatp a lieu de façon saturable (Km=18,9µM) (Kontaxi *et al*, 1996).

Au niveau de la paroi luminale des cellules tubulaires, le transport actif de l'OTA s'effectue par trois types de transporteurs : les transporteurs de la phénylalanine, de H⁺/dipeptides et les transporteurs des anions organiques (Sokol *et al*, 1988 ; Babu *et al*, 2002). Au niveau basolatéral, seuls les transporteurs des anions organiques véhiculent l'OTA dans les cellules rénales et son transport est spécifiquement inhibé par des inhibiteurs des Oat (Stein *et al*, 1985 ; Jung *et al*, 2001). Au niveau du tubule proximal, l'implication des Oat 1 et 3 a été mise en évidence pour le transport entrant de l'OTA. Ce transport est dépendant de la dose et est saturable (Km = 0,42 µM pour hOat1 et Km= 0,75µM pour hOat3) (Jung *et al*, 2001). Au niveau rénal, la clairance de l'OTA dépend de la filtration glomérulaire, de la sécrétion tubulaire et de la réabsorption (Inui *et al*, 2000 a, b ; Dresser *et al*, 2001 ; Dahlmann *et al*, 1998). La fixation de l'OTA sur l'albumine sérique (Il'ichev *et al*, 2002a, b) limite sa filtration glomérulaire. L'OTA a, de plus, la capacité de se complexer aux protéines rénales (Schwerdt *et al*, 1999b). La liaison de l'OTA à une protéine de 62kDa, présente dans les cellules du tubule proximal, est suspectée de contribuer à l'accumulation de l'OTA dans le rein, augmentant sa néphrotoxicité. Des différences, en fonction du sexe et de l'espèce, sont notées concernant la liaison de l'OTA aux protéines rénales. Les protéines rénales, dont notamment un transporteur d'anion organique, ont une affinité trois fois supérieure pour l'OTA chez les rats mâles, par rapport aux protéines des rats femelles (Heussner *et al*, 2002). Ceci peut expliquer les différences observées entre mâles et femelles concernant le stockage et la toxicité de l'OTA.

Les transporteurs présents au niveau hépatique et rénal chez le rat et l'homme sont présentés sur la figure 4 ci-après (Kusuhura & Sugiyama, 2002).

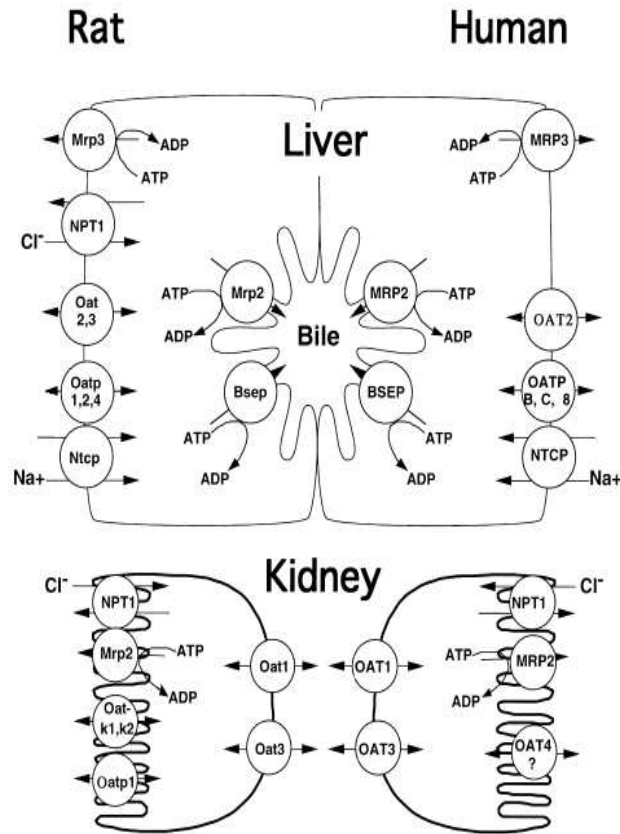


Figure 4. : Description des différents transporteurs présents au niveau du foie et du rein des rats et des hommes (d'après Kusuhara & Sugiyama, 2002).

Les mêmes familles de transporteurs sont décrites chez l'homme et chez le rat, au niveau hépatique et rénal mais les isoformes présents diffèrent. Chez le rat, au niveau rénal, les transporteurs d'anions organiques (Oat) permettent l'entrée des anions organiques et des xénobiotiques (Oat 1, Oat 3) ainsi que leur excretion (Oat k1 et Oat k2). Les Mrp2 et Oatp1, exprimés au niveau rénal permettent l'excretion des xénobiotiques. Dans le foie, bien que les mêmes systèmes de transport soient décrits, les isoformes de ces transporteurs sont différents. On ne retrouve pas l'isoforme 1 des Oats, lequel est impliqué au niveau rénal dans le transport entrant, mais l'isoforme oat2, faiblement présent au niveau rénal est exprimé dans le foie. Les isoformes 2 et 3 des MRP permettent la sortie des xénobiotiques au niveau hépatique. Au niveau du cerveau, seul l'isoforme 4 de l'Oat intervient dans le transport entrant et sortant des xénobiotiques. Ces différences concernant l'expression de ces transporteurs dans les différents organes expliquent les variations observées dans les paramètres de stockage.

Le transport de l'OTA par les Oats est influencé de façon différente par les substrats de ces Oats, et ce, en fonction de l'isoforme exprimée : des concentrations différentes en inhibiteurs seront nécessaires pour annuler le transport de l'OTA par Oat 1 ou celui par Oat 3. Il est à noter que la citrinine, une mycotoxine fréquemment associée à l'OTA dans les céréales, entre en compétition avec l'OTA pour son transport au niveau rénal par Oat 3 alors que le transport par Oat 1 n'est pas modifié par la présence de CIT (Jung *et al*, 2001). Dans une étude menée chez des rats, il a été montré que l'accumulation et l'élimination de l'OTA étaient modulées par une co-exposition à la citrinine (Molinié, 2004). L'accumulation de l'OTA dans les organes résulte de la liaison de celle-ci aux protéines, ce qui limite son excretion. De plus, les phénomènes d'excretion de l'OTA sont également saturables, pour des valeurs intervenant avant la saturation du transport entrant de l'OTA : ceci contribue à l'accumulation de l'OTA dans l'organe. Au niveau rénal, la sécrétion trans-épithéliale de l'OTA est saturée plus rapidement que l'entrée d'OTA : le pourcentage d'OTA, entré dans le rein, qui sera sécrété, diminue quand la concentration en OTA augmente (Bahneman *et al*, 1997).

2.2.1.1.2.3 Excretion et métabolisation de l'OTA

L'OTA est éliminée par toutes les voies d'excrétion (urinaire, fécale et biliaire). Une partie de l'OTA, qui se retrouve dans la bile, peut être réabsorbée au niveau de l'intestin (Fuchs *et al*, 1988b). Dans le rein, l'OTA est filtrée au niveau du glomérule, puis, est sécrétée au niveau du tube contourné proximal dans la lumière tubulaire. Trente à quarante pourcents est éliminé par voie urinaire (Storen *et al*, 1982). Seulement 25 % de l'OTA, au niveau du tubule, provient de la filtration globuliforme. Le reste est issu de la sécrétion active de l'OTA, vers la lumière tubulaire, par les transporteurs des anions organiques (Schwerdt *et al*, 1996, 1998). La sécrétion tubulaire est un mécanisme saturable, ce qui explique son accumulation dans le rein (Bahnmann *et al*, 1997). De plus, l'exposition chronique à l'OTA induit une diminution de la capacité du tubule proximal à excréter les anions organiques (Gekle & Sibernagl, 1996). L'OTA emprunte elle-même les transporteurs d'anions organiques pour son excrétion (Jung *et al*, 2001 ; Babu *et al*, 2002), et peut par ce mécanisme réduire sa propre élimination par la voie urinaire. 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. 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.

L'OTA est métabolisée dans les organes afin de faciliter son excrétion. L'OTA est hydrolysée *in vitro*, en OT α et en phénylalanine, par les enzymes protéolytiques de la digestion : l' α -chymotrypsine et la carboxypeptidase (Pitout, 1969). L'hydrolyse de l'OTA en Ota a majoritairement lieu au niveau stomacal et intestinal, le foie et le rein ayant une faible capacité de métabolisation de l'OTA en ce dérivé (Suzuki *et al*, 1977 ; Kanisawa & Suzuki, 1978 ; Hansen *et al*, 1982 ; Størmer *et al*, 1983). *In vitro*, deux épimères hydroxylés, la 4-R-hydroxyochratoxine A et la 4-S-hydroxyochratoxine A, ont pu être mis en évidence suite à l'incubation d'OTA avec des microsomes hépatiques de rats, de porc ou d'homme (Størmer *et al*, 1981). Ces métabolites peuvent être également générés par les microsomes de reins (Hietanen *et al*, 1986), et les cultures de cellules épithéliales bronchiques humaines (Pinelli *et al*, 1999 ; El Adlouni *et al*, 2000). L'incubation de l'OTA avec des microsomes de foie de lapin ou de rein de porc conduit à la formation de la 10- hydroxyochratoxine A (10-OHOA) (Størmer *et al*, 1983 ; Petkova-Bocharova *et al*, 2003b, Faucet-Marquis, 2005). La forme ouverte de l'OTA (OP-OA) a été retrouvée *in vivo* dans la bile et l'urine de rat par Li *et al* (2000) (Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2006). Dai *et al* (2002) ont montré, *in vitro*, que l'incubation d'OTA, en présence d'un excès de glutathion réduit, aboutissait à la formation d'un conjugué OTQ-glutathion. Le dérivé OTHQ est retrouvé, *in vivo*, dans l'urine de rats traités par des doses d'OTA de 2mg/kg de poids corporel durant deux semaines (Mally *et al*, 2004). La formation de ces différents métabolites est modulée par des agents influençant la conjugaison au glutathion (Faucet-Marquis *et al*, 2006). L'ensemble de ces métabolites a une demi-vie d'élimination inférieure à celle de l'OTA. La pharmacocinétique d'élimination de l'OTA et de ses métabolites a été étudiée, chez le rat, par l'équipe de Li *et al*, (1997). Les demi-vies d'élimination respectives de l'OTA, de l'OP-OA, de l'OT α , de la 4-OH-OTA, de l'OTB et de l'OTC sont les suivantes en heures : 103 \pm 16 ; 50 \pm 2,8 ; 9,6 \pm 2,3 ; 6 \pm 0,9 ; 4,2 \pm 1,2 ; 0,6 \pm 0,2. L'OTA, l'OTB, et l'OT α sont essentiellement éliminées par les urines (plus de 48 %) et la 4-OH-OTA par la bile (41%) (pour une revue, voir Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006)

2.2.1.2 Effets toxiques de l'OTA

2.2.1.2.1 Toxicité aiguë

L'OTA a été impliquée dans beaucoup de mécanismes toxiques, incluant des effets néphrotoxiques, mutagènes, tératogènes, neurotoxiques, hépatotoxiques, immunotoxiques et cancérigènes (pour une revue, voir Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002a). La toxicité aiguë de l'OTA varie en fonction de l'espèce, du sexe mais également en fonction de la voie d'administration de la toxine. (Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999).

la DL₅₀ est comprise entre 0,2 mg/kg pc pour le chien et 30,3 mg/kg pour le rat mâle. D'autre part, l'administration par voie intrapéritonéale d'OTA entraîne un effet toxique supérieur à celui d'une administration par voie orale. L'OTA a de nombreux effets délétères sur différents organes : le rein est

l'organe cible de l'action toxique de l'OTA mais celle-ci pourra également toucher le foie, le cœur ou les intestins. (Pour une revue, voir Pohland *et al*, 1992 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002a ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999).

L'exposition des animaux à l'OTA va se traduire, d'un point de vue économique, par des pertes au niveau de la production importantes. On note une réduction de la ponte des poules, accompagnée d'une baisse de la prise d'aliments se traduisant par un gain de poids moindre (Prior *et al*, 1980).

Cependant, la toxicité de l'OTA se caractérise plus par une toxicité de type subaiguë, liée à l'ingestion de façon chronique de faibles doses de toxine. Quelques effets toxiques, liés à une exposition subchronique à l'OTA, sont décrits ci-après.

2.2.1.2.2 Néphrotoxicité.

L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testées, à l'exception de ruminants adultes (Ribelin *et al*, 1978). Des études effectuées au Danemark, en Hongrie, en Scandinavie et en Pologne, ont montré que l'OTA pourrait jouer un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine, même si la citrinine pourrait être également impliquée (Krogh *et al*, 1973, 1974). Expérimentalement, des porcs exposés de façon chronique à 0,2 ppm d'OTA développent des néphropathies en quelques mois. Aux doses de 1 à 1,4 ppm d'OTA, une décoloration des reins et des nécroses apparaissent après deux semaines d'exposition (Elling *et al*, 1985). Kane *et al*, (1986a) ont constaté chez des rats, traités par gavage avec 290 µg d'OTA/kg de poids corporel tous les 2 jours pendant 8 à 12 semaines, une augmentation significative dans l'urine de trois enzymes caractéristiques d'une nécrose de la bordure en brosse des tubules proximaux : la phosphatase alcaline, la leucine aminopeptidase, et la γ -glutamyl transpeptidase. Parallèlement, ces enzymes diminuent dans le néphron, confirmant la cytotoxicité de l'OTA au niveau des tubules contournés proximaux. Dès 1972, Krogh a montré des similitudes entre la néphropathie porcine et la Néphropathie Endémique des Balkans (BEN), et propose l'OTA comme l'un des agents qui pourrait jouer un rôle dans l'étiologie de cette maladie. La BEN est une néphropathie caractérisée par une tubulonéphrite interstitielle avec enzymurie. L'évolution de la pathologie est lente et souvent asymptomatique. A long terme, elle conduit à une atrophie rénale sévère voire, à des tumeurs du tractus urinaire chez l'homme (Chernozemsky *et al*, 1977 ; Markovic, 1985). Des études épidémiologiques mettent en avant le lien entre la présence d'OTA dans la nourriture, et l'incidence de la BEN (Petkova-Bocharova *et al*, 1988). Récemment, Pfohl-Leszkowicz *et al* (2002) ont résumé, dans un article de synthèse, les différents facteurs pouvant intervenir dans l'étiologie des tumeurs du tractus urinaire associées à la BEN, évoquant le rôle de l'OTA.

L'effet nécrosant de l'OTA, observé au niveau du rein, peut être lié à un mécanisme de peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique a été impliquée dans les mécanismes d'action de xénobiotiques ayant pour effet des altérations tissulaires (Halliwell & Gutteridge, 1988). Il a été montré que l'OTA augmentait la peroxydation lipidique *in vivo* et *in vitro* (Rahimtula *et al*, 1988 ; Hoehler *et al*, 1996a). La néphrotoxicité peut également être liée à l'inhibition de la synthèse protéique par l'OTA. *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 phénylalanine-tARN synthétase (Creppy *et al*, 1983a). Il en résulte un arrêt de la réaction d'amino-acylation et de l'élongation peptidique. La synthèse d'ARN messager peut être également inhibée (Meisner *et al*, 1983). Ces effets n'ont pas été confirmés pour l'instant *in vivo*.

Le transport de l'OTA au niveau rénal se fait par l'intermédiaire des transporteurs d'anions organiques (Schwerdt *et al*, 1998 ; Groves *et al*, 1998, Jung *et al*, 2001). L'inhibition par l'OTA des mécanismes de transport anionique des membranes basolatérales et de la bordure en brosse des cellules tubulaires, par compétition avec les anions organiques pour ces transporteurs, est également mise en cause dans le mécanisme néphrotoxique de l'OTA (Sokol *et al*, 1988 ; Babu *et al*, 2002). De plus, la production d'ATP par les mitochondries, nécessaire à ces transporteurs, est inhibée par l'OTA (Wei *et al*, 1985). Ainsi, l'OTA filtrée est réabsorbée au niveau des tubules proximaux où elle s'accumule. Son élimination dans les urines par le processus sécrétoire est de ce fait diminuée, et ses effets toxiques sont augmentés (Schwerdt *et al*, 1996).

2.2.1.2.3 Carcinogénicité.

Dès 1971, Purchase & Van der Watt ont émis l'hypothèse que l'OTA est cancérigène : ceci a été envisagé suite au fait qu'un rat, parmi un groupe de 10 rats Wistar ayant reçu chacun une dose de 300 µg/kg d'OTA, 5 jours par semaine pendant 50 semaines, avait développé un cancer rénal. Chez des souris ayant reçu une nourriture contaminée par de l'OTA, des tumeurs rénales et hépatiques sont apparues (Kanisawa & Susuki, 1975). Les effets cancérigènes de l'OTA sur des souris ont été vérifiés par l'étude de Bendele *et al* (1985b). Deux groupes de souris (49 mâles et 49 femelles) ont été nourris, pendant 24 mois, avec une alimentation contenant 40 µg d'OTA par kg de nourriture. Tous les mâles souffraient de néphropathie. Parmi ceux-ci, 14 ont développé des carcinomes rénaux et 26 des adénomes rénaux. Peu de femelles souffraient de néphropathies et aucune n'avait développé de carcinome ou d'adénome rénal. Cependant, une augmentation du nombre de néoplasmes hépatocellulaires a été observée chez les mâles et les femelles traités. L'étude du programme national de toxicologie américain (NTP) sur des rats F344/N mâles et femelles, a permis de confirmer le pouvoir cancérigène de l'OTA (Boorman, 1989). Trois doses d'OTA, 210, 70 et 21 µg d'OTA par kg de poids corporel, par jour, ont été administrées à ces rats, par voie orale, pendant deux ans. Pour la forte dose d'OTA, 72 % des mâles et 16 % des femelles ont développé des néoplasmes. Pour la dose de 70 µg d'OTA, l'incidence des néoplasmes est de 39 % pour les mâles et 4 % pour les femelles. A ces 2 doses, l'OTA provoque également des modifications rénales non néoplasiques, comme des hyperplasies, des proliférations cellulaires, des altérations cytoplasmiques, des karyomégalies au niveau des cellules tubulaires et des dégénérescences de l'épithélium tubulaire. Ces deux études, menées avec les souris et les rats F344, mettent en évidence une plus forte sensibilité de la part des rats mâles. Cette observation est confirmée par une étude, effectuée par le Centre Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC), sur deux espèces de rats (Lewis et Dark Agouty), qui a montré une susceptibilité plus importante des rats mâles par rapport aux femelles. La différence est beaucoup plus flagrante dans l'espèce Dark Agouty où les mâles développent des tumeurs alors que les femelles sont complètement épargnées (Castegnaro *et al*, 1998). Des études concernant le patrimoine génétique des rats ont permis de mettre en évidence que la différence de susceptibilité était essentiellement liée au CYP 2C, qui est de nature différente chez le mâle et la femelle (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998).

Lors de la dernière évaluation réalisée par le CIRC (IARC, 1993), l'OTA a été classée dans le groupe 2B : c'est-à-dire qu'elle est considérée comme un « cancérigène possible pour l'homme ». En effet, les études épidémiologiques, faites sur les patients bulgares, n'ont pas été prises en compte car le groupe de travail a estimé qu'il était difficile de séparer les patients atteints de BEN de ceux atteints de cancer des voies urinaires, bien qu'il soit démontré que la BEN est associée à une augmentation significative du nombre de tumeurs des voies urinaires supérieures et qu'elle peut être directement reliée à la consommation de nourriture contaminée par l'OTA dans cette région (Markovic, 1985 ; Chernozemsky *et al*, 1977 ; Castegnaro *et al*, 1987). Le développement de tumeurs rénales, suite à l'ingestion de faibles doses d'OTA par des rats, sur toute la durée de la vie des animaux, a été mise en évidence par Mantle *et al* (Mantle *et al*, 2005 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002b).

2.2.1.2.4 Génotoxicité et mutagénicité

L'OTA exerce son potentiel toxique, et notamment génotoxique, au niveau des organes où elle est stockée. La plupart des études de mutagénicité utilisant le test d'Ames sur *Salmonella typhimurium* TA 98 et TA102, en présence ou non, de systèmes de métabolisation (surnageants S9 de foie de rats), ne mettent pas en évidence le potentiel mutagène de l'OTA (Bendele *et al*, 1985a ; Wurgler *et al*, 1991 ; Föllman & Lucas, 2003 ; NTP, 1989 ; Zepnik *et al*, 2001). De même, aucune recombinaison mitotique n'est observée chez *Saccharomyces cerevisiae* D3 après exposition des cultures à l'OTA (Krogh, 1987).

Deux études ont néanmoins démontré le potentiel mutagène de l'OTA sur les souches de *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 1535 et TA 1538, par l'utilisation de ce même test, en présence de microsomes de reins de rats ou du milieu de culture d'hépatocytes exposés à l'OTA (Obrecht-Pflumio *et al*, 1999 ; Hennig *et al*, 1991) : ceci prouve que certains métabolites de l'OTA, formés par des voies autres que celles des CYPs, ont un rôle dans la mutagénicité. De même, le potentiel génotoxique de l'OTA a été mis en évidence par la recherche de cassures simples brins de l'ADN, par l'échange de chromatides sœurs, par la formation de micro-noyaux ou celle d'adduits à l'ADN (Creppy *et al*, 1985 ; Follman *et al*, 1995 ; Ehrlich *et al*, 2002 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002b ;

Dönmez-Altuntas *et al*, 2003 ; pour un article général, voir Mally & Dekant, 2005 ; Simarro Doorten *et al*, 2006 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006). Une désorganisation de la synthèse d'ADN par modification de la réparation, a été observée, en culture, dans les hépatocytes de rats ACI et de souris C3H (Mori *et al*, 1984). L'OTA affecte également l'expression de gènes dans les reins de rats, vraisemblablement par un mécanisme post-transcriptionnel (Meisner & Cimbala, 1986). La formation de micro-noyaux, de façon dose dépendante, a été mise en évidence sur des cultures de vésicules séminales de bélier (Degen *et al*, 1994, 1997).

In vivo, la preuve de la génotoxicité de l'OTA a été amenée par l'observation de cassures simples brins à l'ADN de rein, de foie, et de rate de souris Balb C ayant reçu de l'OTA par voie intrapéritonéale (2,5mg/kg), ainsi qu'à l'ADN de rein et de foie de rat ayant reçu l'OTA par gavage (289µg/kg/48 heures pendant 12 semaines) (Creppy *et al*, 1985 ; Kane *et al*, 1986b). L'OTA induit la formation d'adduits à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1991, 1993a 1993b, 1993c ; Petkova-Bocharova *et al*, 1998 ; Miljkovic *et al*, 2002 ; pour une revue voir Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005). Ces adduits à l'ADN n'ont pas été mis en évidence suite à l'exposition de rats à de l'OTA radiomarquée au tritium (Schattler *et al*, 1996 ; Gautier *et al*, 2001 ; Mally *et al*, 2004) ; néanmoins, ces adduits à l'ADN ont été caractérisés par la méthode de post-marquage des adduits au ³²P, méthode dix fois plus sensible que celle faisant intervenir l'OTA radiomarquée, suite à une exposition à l'OTA (pour une revue, voir Mally & Dekant, 2005). La formation de ces adduits à l'ADN est dépendante de la dose testée (Petkova-Bocharova *et al*, 1998 ; Miljkovic *et al*, 2002 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005). Les adduits apparaissent plus précocement au niveau du rein, après 8 heures, par rapport au foie ou à la rate, où ils ne sont détectés qu'après 24 heures. Ces adduits rénaux persistent au-delà de 16 jours alors qu'au niveau hépatique, la réparation est complète dès 5 jours (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1993a ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1993b). Des adduits, semblables à ceux observés *in vitro*, sont détectés à l'ADN de tumeurs rénales et de tumeurs de vessie d'individus Bulgares souffrant de BEN (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1993c ; Castegnaro *et al*, 2006a ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005 ; Azemar, 2000). La synthèse de standards de l'OTA, OTA liée de façon covalente au carbone 8 de la guanine, a permis d'identifier, par co-migration, les adduits formés suite à l'exposition à l'OTA sur l'ADN rénal : deux adduits ont été caractérisés comme étant formés par la liaison de la molécule d'OTA sur la guanine par un atome d'oxygène de l'OTA, ou par le carbone de l'OTA (Faucet-Marquis, 2005 ; Faucet *et al*, 2004 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005). Les effets génotoxiques de l'OTA ont été décrits en détail (Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006 ; Manderville, 2005 ; Turesky, 2005).

L'expression du potentiel génotoxique et mutagène de l'OTA implique sa métabolisation par les cytochromes P450 (CYPs) ou par la voie de la cycloxygénase et de la lipoxygénase (COX/LOX.). L'inhibition de la voie des COX/LOX, conduit à une diminution de la quantité d'adduits formés à l'ADN suite à l'exposition à l'OTA *in vivo* (Obrecht-Pflumio *et al*, 1996) et *in vitro* (Pinelli *et al*, 1999). A l'inverse, l'induction de cette voie entraîne une augmentation du niveau d'adduction dans le rein de souris exposées à l'OTA (Grosse *et al*, 1997a). Chez le porc, la formation des adduits à l'ADN a été corrélée, d'une part, à l'induction de la COX2, et, d'autre part, à l'inhibition de la COX1 (Petkova-Bocharova *et al*, 2003b). L'étude de la biotransformation de l'OTA par des microsomes de rein de lapin sur un modèle cellulaire épithélial bronchique humain, montre l'implication du CYP2C9 (P450 époxygénase), en combinaison avec la glutathion transférase, dans la bioactivation de l'OTA en dérivé génotoxique (El Adlouni *et al*, 2000 ; Simarro Doorten *et al*, 2004, 2006). De même, la fréquence de mutation est augmentée suite à l'exposition de cellules exprimant le CYP2C de façon stable (De Groene *et al*, 1996a). L'implication du CYP 2C dans la génotoxicité de l'OTA, CYP induit par les hormones sexuelles (Gustafsson *et al*, 1983 ; Kamataki *et al*, 1983, 1985), peut expliquer la susceptibilité au potentiel génotoxique de l'OTA de façon dépendante du sexe (Castegnaro *et al*, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998 ; O'Brien *et al*, 2001 ; Dietrich *et al*, 2001 ; Simarro Doorten *et al*, 2006). L'activité des CYPs est également modulée suite à l'exposition des cellules à l'OTA, ceux-ci pouvant être tantôt induits ou inhibés en fonction de la famille (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998 ; Petkova-Bocharova *et al*, 2003b), les CYPs 1A1, 1A2, 2C10 et 3A4 augmentant le potentiel mutagène de l'OTA de façon dose-dépendante (De Groene *et al*, 1996b ; Grosse *et al*, 1997b). De plus, l'implication des voies de métabolisation dans l'apparition de la toxicité de l'OTA est soutenue par l'observation que l'expression de certains variants alléliques des CYPs corrélés avec une augmentation de la fréquence de BEN (Atanasova *et al*, 2005).

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

2.2.2.1 Estimation de l'exposition humaine à l'OTA

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

En 1994, la Commission européenne a créé un groupe de coopération scientifique (SCOOP Task 3.2.2) pour rassembler des données sur l'apport d'OTA par le régime alimentaire dans l'Union Européenne ; en 1995, un premier document a été publié (European 1995 842/id). Compte tenu de l'intérêt croissant des autorités publiques à fixer des teneurs maximales tolérables pour certains contaminants d'origine naturelle, en particulier les aflatoxines et l'OTA, dans les denrées alimentaires, et, grâce à la disponibilité de données rapportées récemment, la commission a décidé (Décision 1999/143/EC) d'établir le rapport « Assurance sur l'apport d'ochratoxine A par le régime alimentaire dans l'Union Européenne » (European 2002 841/id). Treize Etats Membres ont collaboré à cette enquête qui, de nos jours, reste la plus récente et la plus détaillée. Cependant, on peut noter l'absence de certains pays tels que la Belgique dans la collection des données. L'estimation des résultats n'est qu'un reflet qui mériterait d'être affiné dans la mesure où ont été prises en compte des valeurs obtenues par diverses méthodes d'analyses (ELISA ou HPLC) dont les limites de quantification peuvent varier d'un facteur 2 à 10. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Produits alimentaires	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	Pourcentage d'échantillons positifs	Ochratoxine A µg/Kg	
				Moyenne 1 ^a	Moyenne 2 ^b
Céréales (ensemble)	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

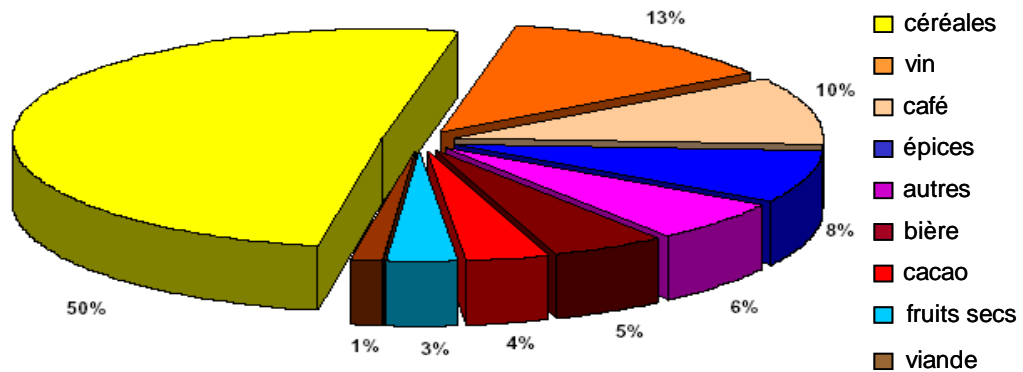
d Beurre, haricots secs, jus de raisin, huile d'olive etc...

tableau 6. : Données concernant la fréquence et le taux de contamination en OTA de divers aliments. D'après SCOOP Task 3.2.7, European 2002)

L'ensemble de ces résultats confirme la présence de l'OTA dans une grande variété de denrées alimentaires, telles que les céréales, le café, la bière, le vin ou la viande. Les teneurs rencontrées sont variables et peuvent aller de quelques ng/kg (à la limite de quantification), à plusieurs µg/kg (un échantillon de café vert contenait 200 µg/kg d'OTA). L'OTA a été détectée dans 55 % des échantillons de céréales analysées, à des taux compris entre quelques µg/kg et 33 µg/kg (Danemark). Le seigle apparaît comme la denrée présentant les teneurs moyennes en OTA les plus élevées, avec 53

% d'échantillons positifs. Le cacao s'est avéré comme la denrée la plus fréquemment contaminée (81 %), mais avec des teneurs relativement faibles en OTA (en moyenne 0,277 µg/kg).

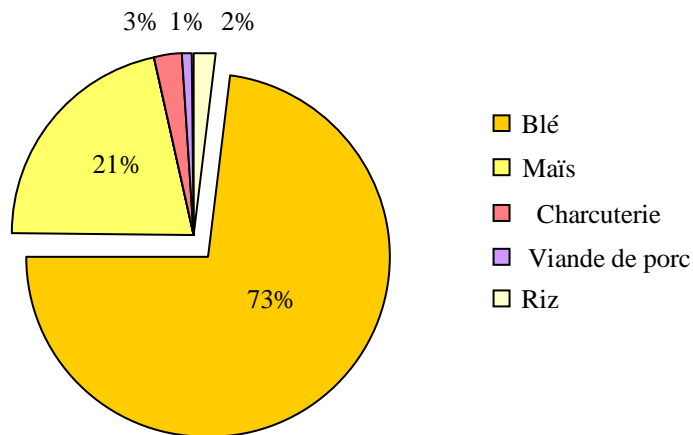
En Europe, la part respective de chacune de ces denrées dans l'exposition de l'homme à l'OTA a été analysée à partir des résultats obtenus pour chacun des pays. (cf graphe 1).



Graphe 1. Contribution de chaque denrée alimentaire dans l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA. D'après SCOOP Task 3.2.7, European, 2002.

Les céréales constituent la source principale de la consommation humaine d'OTA, avec 50% de l'apport en cette toxine. Le vin et le café constituent également une source non négligeable d'apport d'OTA avec respectivement 13 et 10 % de contribution à l'exposition.

En France, le conseil supérieur d'hygiène publique (CSHPF) a réalisé, à partir d'analyses faites par l'observatoire des consommations alimentaires, une évaluation de la part respective de 8 produits alimentaires dans la consommation moyenne en OTA par l'ensemble de la population française (graphe 2).



Graphe 2. : Part des différents aliments dans la consommation moyenne d'OTA dans l'ensemble de la population Française (en ng/jour x kg poids corporel) (d'après Verger et al, 1999)

Il apparaît que près des trois quarts de l'OTA ingérée par l'homme a pour origine le blé. Ceci est lié au fait que le blé est fréquemment contaminé en OTA (cf tableau 10), et que, cette céréale est à la base de l'alimentation humaine (321 kilos/an et par habitant en France en 2003). Le maïs participe à l'exposition de l'homme à l'OTA pour 21%, le riz pour 2%, la charcuterie de 3%, et la viande de porc de 1%. En France, le pain et les biscottes contribuent, pour un tiers, à l'exposition de l'homme à l'OTA. La consommation de ces aliments contaminés conduisent à une exposition non négligeable de la population française à l'OTA : jusqu'à 25% des enfants de 3 à 14 ans, et jusqu'à 15% des adultes végétariens, sont exposés à des doses journalières supérieures à la dose journalière tolérable

préconisée par la JECFA, les adultes ayant un régime alimentaire normal n'étant que faiblement exposés (Leblanc, 2004).

2.2.2.1.2 Suivi des marqueurs d'exposition

Une autre façon d'évaluer l'exposition de l'homme à l'OTA, mise à part l'analyse des taux de contamination en OTA dans les aliments, consiste à rechercher la présence de la toxine dans les fluides biologiques. Six pays (Allemagne, Italie, Norvège, Espagne, Angleterre et Suède) ont fourni des analyses de la teneur en OTA dans le sang pour le rapport européen (SCOOP Task 3.2.7, European 2002, Miraglia & Brera, 2002). Sur un ensemble de 2712 échantillons de sang, 2419 contenaient des traces d'OTA, 96 avaient des taux allant de 1 à 1,9 ng/ml, 47 étaient compris entre 2 et 5 ng/ml d'OTA, et un seul atteignait le taux de 5,58 ng/ml.

Les premières études sur les teneurs sériques en OTA, ont été réalisées dans la région des Balkans (Hult *et al*, 1982 ; Petkova-Bocharova *et al*, 1988), car il a été supposé que l'OTA était l'un des principaux agents responsable de la Néphropathie Endémique des Balkans (BEN) et du cancer du tractus urinaire qui lui est associée (pour une revue, voir Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002a). Différentes études ont suggéré une corrélation entre l'exposition à l'OTA et l'incidence de cette maladie (Petkova-Bocharova & Castegnaro, 1991 ; Nikolov *et al*, 1996). Très récemment, il a été confirmé que les populations des régions balkaniques sont nettement plus exposées à l'OTA, par la nourriture, que les autres populations (Vrabcheva *et al*, 2004 ; Petkova-Bocharova *et al*, 2003 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005 ; Castegnaro *et al*, 2006a). Au Danemark, sur 144 échantillons de sérum collectés, 54,2 % ont des teneurs en OTA allant de 0,1 à 13,2 ng/ml (Hald, 1991). En Pologne, parmi 1065 échantillons sanguins analysés, 7 % présentaient des teneurs en OTA supérieures à 1 ng/ml (Golinski *et al*, 1991). En France, les teneurs sériques en OTA ont été mesurées dans deux types de population (rurale et citadine) de trois régions : Aquitaine, Alsace, et la région Rhône-Alpes (Creppy *et al*, 1993). Ces trois régions ont été choisies car elles ont des habitudes alimentaires très différentes : l'Alsace pour sa forte consommation en produits à base de porc, en bière et en pain ; la région Aquitaine, pour sa consommation en canard nourri aux céréales ; la région Lyonnaise comme région "standard". La limite de quantification pour cette étude est de 0,1 ng d'OTA /ml de sang. Le pourcentage d'échantillons supérieurs à 2 ng/ml est plus élevé dans la population rurale que dans la population citadine (3% en Alsace ; 10 % en Aquitaine et 0,5 % en Rhône-Alpes). Dans cette étude, il est apparu une nette stratification au cours de l'analyse des échantillons de la région Lyonnaise. Ainsi, les ruraux étaient plus contaminés en OTA que les citadins ; une valeur intermédiaire était mesurée pour les citadins vivant en zone rurale. A l'exception d'une valeur extrême en région Aquitaine, la moyenne de contamination était plus élevée en Alsace. Ainsi, le lien entre la concentration sérique en OTA et l'exposition, *via* l'ingestion d'aliments fréquemment contaminés en OTA, peut être établi. Afin de limiter l'exposition de l'homme à l'OTA, des doses journalières maximales admissibles ont été établies par extrapolation des résultats obtenus avec les études *in vivo*, et des limitations du taux de contamination en OTA dans les aliments contribuant à une exposition significative de l'homme à l'OTA ont été établies.

2.2.2.2 Contamination par l'OTA de l'ensemble de la chaîne alimentaire

L'OTA présente une stabilité élevée et n'est que peu, ou pas, dégradée au cours des procédés de transformation des aliments (cuisson, fermentation, torréfaction...). Elle est par conséquent retrouvée dans les produits dérivés de matières premières contaminées ainsi que dans la viande (Vergier *et al*, 1999 ; Jørgensen, 1998) ou le lait obtenus à partir d'animaux ayant reçu une alimentation contaminée. Le rapport SCOOP 3.2.2 mettait en évidence le fait que, 18% des échantillons de viande analysés étaient contaminés en OTA (tableau 11, paragraphe précédent) : la présence d'OTA dans la viande souligne la possibilité de contaminations indirectes de l'homme par cette toxine. Jørgensen (1998) rapporte la présence d'OTA dans les muscles de porc et de volaille, ainsi que dans les abats. De même, l'OTA a été mise en évidence dans le sang et les tissus d'animaux d'élevage, où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique (Gareis, 1996 ; Hult *et al*, 1980 ; Hult *et al*, 1984 ; Curtui *et al*, 2001). L'OTA peut également être retrouvée dans les volailles suite à l'exposition de ces animaux, *via* l'alimentation (Elling *et al*, 1975 ; Micco *et al*, 1987 ; Bauer *et al*, 1988).

L'OTA peut être transférée dans le lait, contribuant à l'exposition des petits au cours l'allaitement (Ferrufino-Guardia *et al*, 2000). L'OTA a été retrouvée dans le lait humain (Micco *et al*, 1991, 1995 ; Breitholtz-Emanuelsson *et al*, 1993 ; Zimmerli & Dick, 1995 ; Miraglia *et al*, 1995 ; Skaug *et al*, 1998) mais également occasionnellement dans du lait de vache (Breitholtz-Emanuelsson *et al*, 1993). Cependant, une étude menée par « the Food Standards Agency » a montré que la totalité des 100 échantillons de lait de vache analysés au cours de cette étude étaient exempts d'OTA et d'Ota (Food Standards Agency, Survey of Milk for mycotoxins, ref 2001/0143). Ceci peut être expliqué par le fait que l'OTA est partiellement dégradée par les bactéries du rumen des animaux (Hult *et al*, 1976).

L'OTA contamine fréquemment le raisin (Tjamos *et al*, 2004) et est retrouvée dans les produits dérivés tels que le jus de raisin et le vin (pour une revue, voir Varga & Kozakiewicz, 2006). L'OTA est retrouvée dans 88% des jus de raisins rouges et 78% des échantillons de jus de raisins blancs (Majerus *et al*, 2000). Elle est également retrouvée sur 15% d'échantillons de moûts de raisins espagnols à des taux compris entre 0,091 ng/ml et 0,813 ng/ml (Belli *et al*, 2004). L'OTA a été mise en évidence dans du vin importé, ou localement produit, dans un grand nombre de pays : en Europe ou en Afrique incluant l'Algérie, la Finlande, la France, l'Allemagne l'Italie, le Maroc ,la Suisse, le Royaume Uni, l'Espagne et le Portugal. Une contamination supérieure dans les vins rouges a été mise en évidence par rapport à la contamination des vins blancs, ces derniers étant contaminés moins fréquemment et à des taux inférieurs à ceux des vins rouges (Lo Curto *et al*, 2004 ; Blesa *et al*, 2004 ; Brera *et al*, 2005). Les taux de contaminations en OTA, trouvés dans ces échantillons de vin, sont relativement faibles et restent généralement inférieurs à la législation en vigueur. Ainsi, en France, une étude, conduite sur le millésime 1999, montrait que 97% des échantillons contaminés contenaient un taux d'OTA inférieur à 1 ng/ml (Lataste *et al*, 2004). Une étude sur des échantillons de vins Espagnols, dont 62% étaient contaminés en OTA, et sur des vins Italiens, dont 74% étaient contaminés, a mis en évidence une contamination comprise respectivement entre 0,1 et 0,76 ng d'OTA/ml et entre 0,1 et 4 ng/ml (Blesa *et al*, 2004 ; Brera *et al*, 2005). Ainsi, la contamination en OTA persiste tout au long du procédé de transformation du vin, contaminant le raisin de la matière première au produit fini.

De même, l'OTA est retrouvée tout au long de la chaîne de transformation des céréales (Alldrick, 1996). L'OTA, présente initialement sur l'orge (Mc Donald *et al*, 1993 ; Park *et al*, 2002 ; Zinedine *et al*, 2006), est retrouvée dans la bière (Scott & Kanhere, 1995 ; Baxter, 1996 ; Jørgensen, 1998 ; Odhav & Naicker, 2002). En effet, une grande part de l'OTA persiste après le traitement du malt au cours du procédé de fabrication de la bière (Chu *et al*, 1975). Une étude menée par l'IFBM (Institut Français de la Brasserie et de la Malterie, rapport Boivin, P.) a montré que le procédé de maltage n'avait pas d'incidence sur le taux d'OTA apporté par l'orge. Par la suite, 80% de l'OTA du malt est retrouvée dans le moût après les étapes d'empâtage et de filtration. Finalement, l'étape de fermentation permet l'élimination de 50% de l'OTA apportée par le moût. Ainsi, la bière produite à partir d'orge contaminée en OTA contiendra au terme du procédé de fabrication 30 à 40% du taux d'OTA initial. L'OTA contaminant le blé, se retrouve dans les produits dérivés. Une analyse des céréales du petit-déjeuner a mis en évidence la présence d'OTA dans 69% des échantillons testés (Molinié *et al*, 2005) parmi lesquels 20% avait un taux supérieur à la législation en vigueur. L'OTA a également été retrouvée dans des aliments pour bébés à base de céréales (Araguas *et al*, 2005), dans les biscuits, le pain ou les pâtes (Verger *et al*, 1999, 2005). Au cours des procédés de transformation des matières premières dans la chaîne alimentaire, on peut parfois observer une réduction significative du taux d'OTA liée au procédé de transformation de la matière première : ainsi, le taux d'OTA peut être réduit de 62% dans les biscuits au cours de leur cuisson, ceci étant lié à leur faible teneur en eau (Osborne, 1979). Le rapport JECFA de 2002, se fondant sur les données recueillies par The Ministry Of Agriculture, Fisheries and Food (1996), montre que la réduction du taux d'OTA dans des biscuits peut atteindre 84%. La réduction du taux d'OTA est par contre très faible au cours de la préparation des nouilles fraîches par exemple. Le taux d'OTA est également réduit au cours de la fabrication du pain ; cependant une différence importante concernant le taux d'OTA dans la farine et par la suite dans le pain peut être observée qu'il s'agisse de farine blanche ou de farine complète. En effet, au cours de la fabrication de la farine, une part du grain de blé est éliminée, ce qui aboutit à une diminution significative du taux d'OTA. Osborne *et al* ont comparé en 1996 le taux d'OTA présent dans une farine blanche ou dans une farine complète préparée à partir de blé sur lequel avait été inoculé un

Penicillium verrucosum. Les parties périphériques du grain de blé, éliminées au cours du broyage, permettent de réduire de 66% le niveau de contamination en OTA dans la farine blanche, préparée à partir d'un blé propre. Par contre, on ne constate qu'une très faible réduction du taux d'OTA au cours de la préparation de la farine complète (réduction de 10%). Par la suite, on observe encore 10% de réduction du taux d'OTA lors de la cuisson du pain blanc. Le dépelliculage préalable des grains avant broyage, permet de réduire de façon beaucoup plus conséquente le taux d'OTA dans les farines blanches et complètes, ainsi que par la suite dans le pain. Ces résultats ont été confirmés par Scudamore *et al*, en 2003, qui parvenait à obtenir une réduction de 75% du taux d'OTA dans le pain blanc en utilisant une combinaison de nettoyage, de dépelliculage et d'élimination des parties périphériques du grain de blé. Cette réduction plus importante du taux d'OTA dans le pain blanc, par rapport au pain complet, en absence de dépelliculage, est liée au fait que 62% de l'OTA est concentrée dans la partie « son » du grain, 34% dans la farine, et 3% dans le rémoulage (rapport IFBM). Actuellement, aucune étape de dépelliculage du grain, en vue de la réduction de la charge en mycotoxine, n'est intégrée au procédé meunier en France.

Des appareils de dépelliculage sont en cours de développement : un outil d'abrasion, adapté au riz, à l'orge et au blé, est proposé par « Satake Corporation UK division », entreprise anglaise fournissant les industries céréalières en usines et équipements. Le procédé Peri tec développé par cette société, décortique progressivement les couches extérieures du son de blé avant la mouture, à l'exception de celles présentes dans la pliure du blé. Ce procédé est développé et proposé aux meuniers, afin d'augmenter leurs capacités de production en diminuant le temps imparti au broyage, augmentant le rendement pour la production de semoule et de rémoulage, et garantissant un meilleur aspect du produit fini. L'entreprise Bühler développe un « DC peeler » : cet appareil a pour but de réduire le taux de contamination en microorganismes, champignons, et métaux lourds de la bière en traitant l'orge et le malt. Celui-ci élimine l'enveloppe du grain de l'orge par un système de rotor permettant l'abrasion de la surface. Cependant, ces appareils génèrent actuellement des sous-produits totalement inutilisables qui doivent être détruits.

L'OTA est également retrouvée au terme des procédés de transformations nécessitant le passage de la matière première à des températures élevées comme la torréfaction. Au cours de la torréfaction, le grain de café est placé à 250°C pendant 150 secondes. Cette étape de torréfaction ne permet de réduire que légèrement le taux d'OTA dans le café torréfié. L'OTA est par la suite retrouvée dans le breuvage (Studer-Rohr *et al*, 1995). L'OTA est également retrouvée dans le café soluble (MAFF, 1996 ; Lombaert *et al*, 2002). Micco *et al* (1989) soutenaient la thèse de l'élimination de l'OTA au cours du procédé de torréfaction ; il est à noter que le traitement à la chaleur a été réalisé, au cours de leur étude, pendant 5 à 6 minutes ce qui est nettement supérieur à la durée de torréfaction testée par Studer-Rohr *et al* (1995) ainsi qu'à la durée classique du procédé de torréfaction. Dans son étude, Studer-Rohr décelait des quantités d'OTA moindres dans le café torréfié, issu de café vert faiblement contaminé en OTA. Cependant, le taux d'OTA présent dans le café boisson était sensiblement identique à celui trouvé dans le café vert. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ceci était dû à une moindre efficacité des procédés d'extraction de l'OTA, ainsi qu'à une épimérisation de l'OTA dans le café torréfié (Suarez-Quiroz, 2004). Ils se sont par ailleurs intéressés à la stabilité de l'OTA à la chaleur, et ont montré qu'une disparition de 50% du taux d'OTA était observée après 12 minutes de traitement à 250°. Ceci est cohérent avec les essais de dégradation de l'OTA par la chaleur testés sur du blé par Boudra *et al* (1995). Ces auteurs ont observé qu'un passage pendant 6 minutes à 250°C est nécessaire pour diminuer de 50% le taux d'OTA présent sur un blé sec. Le temps de chauffage, pour l'obtention du même ratio d'élimination de l'OTA, est réduit en conditions humides.

Il est donc évident que l'ensemble de la chaîne alimentaire est contaminé en OTA et que les procédés de transformations utilisés dans l'industrie agro-alimentaire ne contribuent qu'à une réduction modérée du taux d'OTA. Les conditions de chauffage qui permettraient une franche réduction du taux d'OTA ne peuvent être appliquées à l'ensemble des aliments ce qui rend l'élimination de l'OTA délicate. L'exposition humaine à l'OTA se fait de façon croisée, suite à la consommation des matières premières contaminées, mais également suite à la consommation des produits transformés.

Il est à noter que l'exposition à l'OTA peut également avoir lieu par voie aérienne. Cette voie d'exposition à l'OTA a été mise en évidence chez des hommes en contact avec l'OTA par inhalation dans des industries de transformation de cacao, épices et café, et chez des fermiers (Di Paolo *et al*, 1993). La présence de concentrations en OTA dans le sérum de ces hommes, nettement supérieures à celles d'individus non exposés, a été mise en relation avec la présence d'OTA dans l'air ambiant (Iavicoli *et al*, 2002 ; Brera *et al*, 2002). L'exposition par cette voie peut conduire à l'apparition des effets néphrotoxiques de l'OTA (Di Paolo *et al*, 1993). Ceci peut contribuer dans certaines conditions à l'exposition de l'homme à la toxine.

2.2.2.3 Règlementations et recommandations

En 1990, le JECFA a décidé d'établir une dose journalière tolérable hebdomadaire de 112ng d'OTA par kilo de poids corporel, cette valeur ayant été déterminée sur la base des données de néphropathies porcines. Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, sur la base des études de carcinogénicité, a proposé une exposition journalière tolérable de 5ng/kg pc/jour, ce qui implique une contamination maximale dans les céréales de 5µg/kg. Le comité Scientifique de l'alimentation Humaine a estimé dans son avis sur l'OTA du 17 septembre 1998, qu'il serait prudent de réduire autant que possible l'exposition à l'OTA, en veillant à ce que les expositions se situent près de la fourchette inférieure des expositions tolérables (comprises entre 1,2 et 14 ng/kg de poids corporel et par jour), soit par exemple en dessous de 5ng/kg de poids corporel et par jour. Le règlement CE N° 472/2002 de la Commission du 12 mars 2002 modifie le règlement CE N°466/2001 fixant des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Ce règlement limite la contamination en OTA dans les céréales brutes, y compris sur le riz et le sarrasin, à 5µg d'OTA/kilos. En ce qui concerne les produits dérivés de céréales, la contamination est limitée à 3µg/kg. Ce règlement fait également état d'une limitation à 10µg d'OTA/kg de raisins secs. Par la suite, le règlement CE N° 683/2004 du 13 avril 2004 modifiant le règlement N°466/2001 a inclus une directive limitant la contamination en OTA à 0,5µg/kg d'aliment dans les préparations à base de céréales *et* aliments pour bébés, destinés aux nourrissons et enfants en bas âge, ainsi que dans les aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales pour les nourrissons.

La dernière évaluation de l'OTA a donné lieu au règlement N° 123/2005 modifiant le règlement N°466/2001 qui prend en compte la contribution d'aliments tels que le vin, les jus de raisin ou le café dans l'exposition de l'homme à l'OTA. Ce règlement ne modifie pas les teneurs maximales établies précédemment sur les céréales ou les raisins. Il inclut une nouvelle directive limitant la contamination en OTA dans les jus de raisin, les vins rouges, blancs, et rosés, ainsi que dans les autres boissons à base de vin ou de moût, à 2µg/kg. Une directive vise également à limiter la contamination en OTA dans le café ; celle-ci fixe le taux maximal en OTA à 5µg/kg dans les grains de café torréfiés et à 10µg/kg dans le café soluble. Le règlement CE N° 466/2001 rappelle qu'il est interdit de mélanger des produits conformes aux limitations avec des produits non-conformes, afin d'en abaisser le taux de contamination, et que l'utilisation de produits non conformes aux teneurs établies pour la préparation d'autres aliments est interdite. Il est également interdit d'utiliser des traitements chimiques pour la décontamination en OTA des produits destinés à l'alimentation humaine. Le mode d'échantillonnage, ainsi que les méthodes d'analyses, pour la détermination de la teneur en OTA dans les denrées alimentaires, sont décrits dans la directive 2002/26/CE, publiée au Journal Officiel n°L 075.

Ces directives visant à estimer et à limiter la présence d'OTA dans divers aliments, impliquent la mise en place de plans ayant pour objectif de réduire la contamination des denrées par cette mycotoxine. Diverses stratégies peuvent être adoptées afin d'obtenir des produits en accord avec la réglementation Européenne. Il s'agira d'observer des bonnes pratiques agricoles, ou de décontaminer le produit fini. Les différentes méthodes pouvant être envisagées sont décrites dans le chapitre suivant.

3. Les procédés de décontamination

La présence dans les aliments de mycotoxines, et en particulier, celle d'OTA, pose un problème de sécurité sanitaire des aliments comme vu précédemment. Un rapport de la FAO met en évidence le fait que la production céréalière mondiale est insuffisante pour répondre à la demande. Les pertes occasionnées par la contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines (25% de la production mondiale de céréales contaminées) viennent amplifier le problème lié à une production insuffisante. La mise au point de traitements industriels pour la décontamination et la détoxification des denrées alimentaires contaminées est devenu un des objectifs majeurs pour subvenir aux besoins mondiaux en aliment, tout en garantissant la sécurité sanitaire des aliments. Avant d'en venir à l'utilisation de procédé de décontamination, la meilleure stratégie consiste à observer des pratiques permettant de limiter la survenue de ces contaminants. La maîtrise des étapes précédant la récolte, lors la récolte et pendant le stockage permet de prévenir la contamination, les facteurs environnementaux étant déterminants pour la survenue des contaminations par les moisissures et leurs mycotoxines (Lacey, 1989).

3.1 Stratégie préventive : limitation de la survenue des contaminations

3.1.1 Mise en place d'un plan de contrôle et d'analyse des points critiques (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point)

La directive de l'Union Européenne N° 93/43/CE prescrit la généralisation des principes de la méthode « Hazard Analysis Critical Control Point » ou méthode HACCP au sein de l'Union européenne. Cette méthode consiste en une identification des risques alimentaires potentiels au cours d'une opération. La démarche est basée sur le développement d'une stratégie de prévention, de contrôle, de bonne pratique industrielle et de contrôle de la qualité à toutes les étapes de la production. Il s'agit de mettre en évidence les points à risques, ainsi que les points critiques, de mettre en place des solutions afin de gérer au mieux le risque, ainsi que de développer des méthodes de suivi et de vérification. Ropkins & Beck (2003) ont proposé un plan HACCP pour limiter la contamination par des composés organiques des denrées alimentaires au cours des étapes de stockage, de transformation et de distribution. Des procédures opérationnelles standard sont définies et doivent être respectées à chaque étape. Il s'agit de s'assurer de la bonne qualité sanitaire du site de stockage, celui-ci devant présenter des installations conformes et propres. La contamination externe, *via* l'eau ou l'air doit être surveillée. Des pratiques pour limiter la contamination des aliments doivent être respectées, comme le nettoyage des équipements, une bonne hygiène du personnel et le port de vêtements de sécurité. En cours de stockage, le taux de contamination doit être suivi, et les denrées contaminées doivent être isolées afin d'empêcher les contaminations croisées. Toutes les étapes d'emballage doivent être contrôlées et réalisées avec un matériel propre. Les points critiques ainsi que les mesures de surveillance et de correction sont décrites en détail par Ropkins & Beck (2003).

3.1.2 Le suivi des « bonnes pratiques agricoles »

En ce qui concerne la gestion du risque, lié à la contamination par l'OTA, le suivi des bonnes pratiques agricoles, décrites par un comité d'experts FAO/WHO en 2000, doit permettre de limiter autant que possible la contamination en OTA. Les pratiques à observer, ainsi que les démarches à suivre à chaque étape, du champ à l'assiette du consommateur sont décrites ci après et se décomposent en plusieurs contrôles des étapes (i) précédant la récolte, (ii) pendant la récolte et (iii) pendant le stockage.

3.1.2.1 Pratiques recommandées précédant la récolte

Dans un premier temps, il est recommandé de réduire autant que possible la présence d'inoculum à proximité de la plante. Il est recommandé de préparer le champ avant semaison en éliminant tous les restes des cultures précédentes, ainsi que tout substrat qui serait propice à la croissance de champignons producteurs d'OTA. Il est important de respecter la rotation des cultures (Pfohl-Leszkowicz, 1999a). Tous les traitements qui ont pour effet de réduire le stress de la plante,

permettront de réduire la susceptibilité de celle-ci à la contamination par des moisissures. La semaison, tout comme la récolte, doivent être effectuées à une période où ne sévissent pas des conditions de températures trop élevées ou des conditions de sécheresse, celles-ci contribuant au stress de la plante. De plus, il faut éviter le sur-encombrement du champ en respectant les espaces entre les plantes, recommandés pour le bon développement de l'espèce semée. Il faut également maintenir un environnement dépourvu de mauvaises herbes par l'emploi d'herbicides de façon appropriée ou par l'utilisation d'autres pratiques agricoles, telle que le désherbage manuel. Le sol, enrichi en fertilisants si besoin est, doit subvenir aux besoins nutritionnels de la plante. Les besoins en eau de la plante doivent être satisfaits par une irrigation suffisante et homogène.

Il est recommandé de réduire autant que possible les dommages causés par les insectes ainsi que les infections fongiques, et ce, par l'usage approprié d'insecticides et de fongicides. Les insectes sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur du grain par les lésions qu'ils créent (Le Bars, 1982). Ceux-ci prédisposent par conséquent les grains à des contaminations par les moisissures et les mycotoxines (Farrar & Davis, 1991). L'utilisation de fongicides et de pesticides, est efficace pour limiter le développement des moisissures et la contamination par l'OTA (Lo Curto *et al*, 2004 ; Tjamos *et al*, 2004).

Il est recommandé que le grain soit récolté à pleine maturité et que les dommages mécaniques, liés à la récolte, soient limités autant que possible.

3.1.2.2 Pratiques de stockage

Les facteurs pouvant influencer le développement des moisissures ainsi que la formation d'OTA sont les suivants (pour une revue, voir Pfohl-Leszkowicz, 1999b ; Scudamore, 2005 ; Molinié & Pfohl-leszkowicz, 2002 ; Magan & Aldred, 2005) :

- les conditions climatiques avant et pendant la récolte
- le temps d'attente avant le séchage des grains
- l'efficacité du système de séchage
- l'état physique des grains
- la température au moment de la récolte
- la présence d'espèces fongiques
- la propreté des systèmes de récolte et de transport

Les structures de stockage, ainsi que tout matériel en contact avec la récolte doivent être propres afin de limiter au maximum la contamination de la récolte. Pour le cas où la précédente récolte stockée a été contaminée par des champignons, il est recommandé d'assainir les locaux par des traitements chimiques. Il est recommandé de sécher le grain pour que celui-ci atteigne un taux d'humidité inférieur à 14%. L'humidité du substrat, et en particulier, la disponibilité en eau (a_w), sont des facteurs déterminants pour la croissance fongique. Les moisissures colonisant les denrées au cours du stockage ont la capacité de se développer pour des taux d'humidité compris entre 10 et 18% (Lillehoj & Elling, 1983). La température joue également un rôle déterminant dans le développement fongique ainsi que dans la mycotoxinogénèse. Les conditions optimales de température et d'humidité relatives pour la croissance fongique diffèrent de celles optimales pour la mycotoxinogénèse (Steyn, 1984 ; Suárez-Quiroz *et al*, 2004).

La production de toxine a lieu pour des gammes de températures et d' a_w plus restreintes que celles pour lesquelles le champignon croît. Plus la température et l' a_w sont faibles, plus le champignon aura des difficultés à se développer et à produire de l'OTA.

Le séchage doit être réalisé aussi vite que possible, de préférence immédiatement après la récolte et par un système d'air chaud, pour empêcher la formation d'OTA.

Au cours du stockage, la cellule doit être sèche et ventilée de façon satisfaisante, ceci dans le but de limiter la condensation, d'équilibrer et d'abaisser la température. Les structures doivent permettre de limiter les variations de température et doivent fournir une protection efficace contre la pluie. La présence d'oxygène est un facteur déterminant pour le développement de la plupart des moisissures (Pitt & Hocking, 1997). L'application d'une atmosphère pauvre en O_2 , ou le traitement par fumigation au CO_2 à un taux supérieur à 35%, ou par d'autres gaz (Annis, 1990) doit permettre de réduire la production d'OTA par *Aspergillus ochraceus*. Ces fumigations permettent également

l'élimination des insectes présents dans les cellules de stockage, insectes responsables des dommages causés aux grains. L'utilisation de certains insecticides comme celle du dichlorvos, permet également de réduire la production d'OTA (Wu & Ayres, 1979). La surveillance de l'évolution de la température au cours du stockage peut être révélatrice du développement de moisissures. Une variation de 2 à 3°C de la température peut être le signe d'un développement microbien. Les grains infectés seront séparés des grains sains, et des prélèvements seront constitués pour analyse. La présence simultanée d'autres micro-organismes peut perturber la croissance des champignons toxinogènes, ainsi que la production de mycotoxines, selon des effets inhibiteurs ou stimulateurs de la mycotoxinogénèse (pour une revue, voir Pfohl-Leszkowicz, 1999b). Les sacs utilisés pour l'ensachage doivent être propres, secs et stockés sur des palettes. De même, le système de transport doit être propre, exempt de moisissures, d'insectes, ou de matériel contaminé quel qu'il soit.

La température, et l'humidité sont les facteurs dont le contrôle est impératif afin de limiter autant que possible le développement des moisissures et la production d'OTA. Cependant, le suivi de ces bonnes pratiques agricole n'est pas suffisant pour empêcher la contamination. Des stratégies de décontamination sont développées pour faire face à ce problème.

3.2 Stratégie curative : la décontamination

Jemmali (1979) et Park *et al* (1988) ont proposé des critères spécifiques pour la validation des procédés de décontamination des mycotoxines dans les denrées alimentaires. Pour être considéré efficace, ce procédé doit répondre aux exigences suivantes :

- il doit inactiver, détruire ou éliminer la toxine
- il ne doit pas générer ou laisser de résidu toxique dans le produit
- il doit maintenir la qualité nutritive de l'aliment et doit être acceptable pour l'alimentation humaine et animale
- il ne doit pas modifier de façon significative les propriétés technologiques du produit
- il doit si possible détruire les spores et les moisissures.

Une autre stratégie consiste à limiter les effets toxiques de l'OTA par l'ingestion d'agents chélateurs de la toxine tels que la cholestyramine ou les aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés (Kerkadi *et al*, 1999 ; Plank *et al*, 1990 ; Huff *et al*, 1992 ; Huwig *et al*, 2001), ou par l'ajout d'additifs alimentaires (vitamines, graines de sésame, aspartame, mélatonine, piroxicam ou acides lactiques et sorbiques) contribuant à une protection partielle de l'organisme à la toxicité de l'OTA (Grosse *et al*, 1997a ; Stoev *et al*, 2002 ; Creppy *et al*, 1995 ; Meki & Hussein, 2001 ; Baudrimont *et al*, 1995 ; Laciakovà *et al*, 1999). Ces stratégies ne sont pas décrites de façon détaillée ici (pour une revue, voir Galvano *et al*, 2001), celles-ci ne concernant pas réellement l'élimination de l'OTA présente sur la matrice mais consistant en une séquestration de la toxine ou en une limitation de ses effets toxiques

Des méthodes biologiques, physiques et chimiques sont développées pour la décontamination en mycotoxines (pour une revue, Lopez-Garcia, *et al* 1999). Parmi les méthodes chimiques, l'ammoniation utilisée pour l'élimination des aflatoxines (Park *et al*, 1988 ; Park, 1993) n'est pas efficace pour l'élimination de l'OTA : l'OTA est transformée en sa forme ouverte qui redonnera l'OTA dans les conditions acides de l'estomac (Chelkowski *et al* 1981, Castegnaro *et al*, 1991). Il est à noter que les traitements chimiques ne sont pas autorisés pour la décontamination des aliments destinés à l'alimentation humaine et ceux-ci ne seront par conséquent pas présentés en détail ici.

À ce jour, peu de méthodes sont proposées pour la décontamination de l'OTA, mais plusieurs pistes sont en cours d'investigation, notamment concernant la décontamination biologique. Nous présentons ci-après les méthodes de décontaminations biologiques et physiques développées pour l'élimination de l'OTA.

3.2.1 Méthodes biologiques de décontamination

Il s'agit pour l'instant de pistes concernant la dégradation en milieu naturel de l'OTA par des microorganismes ou des enzymes (pour un article général, voir Bata & Lasztity, 1999). L'identification d'un potentiel de dégradation par un microorganisme est la première étape de développement du procédé. Par la suite, cette activité de décontamination doit pouvoir être transférée sur la denrée contaminée en OTA, étape la plus délicate dans la mesure où les microorganismes

développant ce potentiel décontaminant n'appartiennent pas toujours à la flore microbiologique de l'aliment. L'activité d'enzymes est également testée (Ruhland *et al*, 1994, 1996a, 1996b ; Stander *et al*, 2000, pour une revue, voir Varga *et al*, 2005).

On entend par « décontamination biologique » la transformation enzymatique de l'OTA en un composé moins toxique (Bhatnagar *et al*, 1991). La « dilution » du niveau de contamination en OTA, suite au mélange d'un lot sain et d'un lot contaminé, est une pratique interdite en Europe (règlement CE N°466/2001) mais qui a été largement utilisée auparavant (Patterson & Young, 1993). La dégradation de l'OTA a été mise en évidence au cours du procédé d'ensilage : l'OTA présente sur l'orge est éliminée par la flore microbienne présente (Rotter *et al*, 1990). L'OTA peut également être dégradée par les bactéries présentes dans le rumen des vaches, ce qui rend ces animaux plus résistants aux mycotoxines que les animaux monogastriques. L'OTA est hydrolysée en Ota et phénylalanine (Hult *et al*, 1976) ou est estérifiée en OTC (Galtier & Alvinerie, 1976). *Eubacterium* BBSH797, bactérie isolée du rumen, a été caractérisée par Schatzmayr *et al* (2005) pour son potentiel de dégradation de l'OTA en OTa. La capacité de dégradation de l'OTA en OTa par *Acinetobacter calcoaceticus*, également isolée à partir du rumen, a été mise en évidence *in vitro* sur milieu synthétique à 25 et 30°C (Hwang & Draughon, 1994).

Des enzymes naturelles ont également la capacité de dégrader l'OTA. La dégradation de l'OTA, en divers produits non identifiés, a été mise en évidence par des suspensions de cellules de blé, d'orge ou de maïs. Ces transformations enzymatiques incluent des réactions d'hydrolyse, de méthylation et d'hydroxylation qui conduisent parfois à une perte du potentiel toxique de la molécule (Ruhland *et al*, 1994, 1996a, 1996b). Une lipase, isolée à partir d'*Aspergillus niger* dégrade l'OTA en OTa (Stander *et al*, 2000). D'autres activités enzymatiques, ainsi que d'autres microorganismes, ont été caractérisés pour leur potentiel de dégradation de l'OTA. Ceux-ci sont présentés dans le tableau 7.

Microorganismes ou enzymes	Reference
Microorganismes du rumen	Galtier & Alvinerie, 1976 ; Hult <i>et al</i> , 1976 ; Akiyama <i>et al</i> , 1997
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Westlake <i>et al</i> , 1987
<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp.	Skrinjar <i>et al</i> , 1996
<i>Acetobacter</i> sp.	Hwang & Draughon, 1994
<i>Phenyllobacterium</i> sp.	Wegst & Lingens, 1983
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i>	Varga <i>et al</i> , 2000
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. wentii</i> , <i>A. ochraceus</i>	Abrunhosa <i>et al</i> , 2002
<i>A. niger</i> (lipase)	Stander <i>et al</i> , 2000
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Engelhardt, 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i>	Böhm <i>et al</i> , 2000
Carboxypeptidase A	Deberghes <i>et al</i> , 1995 ; Stander <i>et al</i> , 2001

tableau 7. : potentiel de dégradation de différentes enzymes et microorganismes (d'après Varga *et al*, 2005)

L'OTA est dégradée par des souches de *Rhizopus stolonifer* et *R. microsporus* avec une efficacité pouvant atteindre 96% sur un blé humidifié (Varga *et al*, 2005). *Rhizopus stolonifer* est un pathogène des plantes colonisant celles-ci après récolte. Les *rhizopus* sont les principaux champignons isolés dans les zygomycoses de patients ; cependant, *Rhizopus stolonifer* est rarement mentionné comme un pathogène humain. Les auteurs proposent d'utiliser ces souches pour la décontamination des céréales, après avoir caractérisé les enzymes, ainsi que les gènes, responsables de cette activité de dégradation de l'OTA.

La caractérisation du potentiel de dégradation de l'OTA par certains microorganismes appartenant à la flore microbienne naturelle de l'aliment contaminé, présente un intérêt plus fort que la seule caractérisation des activités enzymatiques. Des souches de champignons, isolées à partir des grappes de raisin et appartenant aux genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* sont capables de dégrader l'OTA à un taux supérieur à 80% sur milieu synthétique (Abrunhosa *et al*, 2002). Deux voies de dégradation différentes ont été mises en évidence en fonction de l'espèce, l'une impliquant

l'activité carboxypeptidase conduisant à la transformation de l'OTA en OT α . De plus, cette capacité de dégradation de l'OTA a été identifiée dans des souches ochratoxinogènes et dans des souches non toxigènes. Ces souches appartiennent à la flore microbienne naturelle du raisin. L'utilisation des souches non toxigènes pour l'élimination de l'OTA sur le raisin peut être envisagée. Les bactéries lactiques et les levures, intervenant dans des procédés de fermentation agro-alimentaires, présentent un potentiel pour la décontamination en mycotoxines des denrées (pour une revue, voir Shetty & Jespersen, 2005). La dégradation de l'OTA présente dans le lait a été mise en évidence par les bactéries du yaourt *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* (Skrinjar *et al*, 1996). *Saccharomyces cerevisiae*, levure utilisée en œnologie, a la capacité d'éliminer l'OTA contaminant fréquemment le vin. L'adsorption des mycotoxines par les levures a été mise en évidence par l'utilisation d'un mélange de levure stérilisé et de résidus de fermentation de la bière : le mécanisme expliquant la disparition de l'OTA *in vitro* suppose l'adsorption de l'OTA sur la paroi des levures (Grunkemeier, 1990). L'élimination de l'OTA par les levures est supérieure quand les levures utilisées sont mortes et atteint 90% d'élimination. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'élimination de l'OTA résulte d'un phénomène d'adsorption dans lequel, le volume de la cellule joue un rôle dans la capacité d'élimination (Bejaoui *et al*, 2004). De plus, l'utilisation de ces levures vivantes, ou mortes, n'entraîne pas de modifications de la qualité du vin. Ce procédé est donc prometteur pour la décontamination en OTA du vin.

Des activités enzymatiques ont été identifiées pour la dégradation de l'OTA, mais leur mise en œuvre en tant que procédé de décontamination reste à être développée. Le potentiel de dégradation de l'OTA par des microorganismes naturellement présents dans l'ensilage ou dans les denrées alimentaires comme le raisin, présente un intérêt pour réduire l'exposition de l'animal et de l'homme à cette toxine. Cependant, actuellement aucun procédé n'est réellement mis en œuvre.

Certaines de ces méthodes biologiques sont très prometteuses pour la décontamination de produits particuliers, comme le vin ou le lait, mais leur extrapolation pour le traitement des céréales n'est pas encore étudiée.

3.2.2 Méthodes physiques de décontamination

3.2.2.1 Situation actuelle

Le nettoyage et le tri permettent d'éliminer une part des mycotoxines sans altérer ni les propriétés nutritives, ni l'aspect des denrées. Cependant, en ce qui concerne l'OTA, le simple nettoyage des grains ne permet pas, ou peu, de réduire la contamination en OTA du grain (Osborne *et al*, 1996 ; Scudamore, 2005).

Le procédé de cuisson associé à l'extrusion implique le passage du matériel brut contaminé, pendant une courte durée, à des températures pouvant être supérieures à 150°C. L'utilisation de ce procédé sur les céréales entraîne des modifications moléculaires et des réactions chimiques qui se traduisent par une gélatinisation de l'amidon, une dénaturation des protéines, une inhibition des activités enzymatiques mais également une réduction de la charge microbienne (Harper, 1989). L'utilisation d'un extrudeur, à des températures comprises entre 168 et 200° C, permet de réduire le taux de contamination en OTA du blé respectivement de 21% et 39% pour des niveaux de contamination initiaux de 10 et 50 μ g/kg (Scudamore *et al*, 2004).

Un décapage du blé, éliminant 2% de la masse du grain, permet de réduire le niveau de contamination en OTA dans le grain de blé de 40% par rapport au grain non traité. Ce traitement préalable a une incidence sur le taux d'OTA qui sera retrouvé dans la farine et le pain complets. Par contre, l'application de ce procédé a une incidence limitée sur la teneur en OTA des farines et pain blancs, celle-ci étant déjà nettement réduite au cours du procédé de fabrication, qui élimine les parties périphériques du grain (Osborne *et al*, 1996 ; Scudamore, 2005).

Le moulage humide est un procédé développé sur le maïs qui permet d'en réduire la charge en toxines : 43% de l'OTA est éliminée dans les eaux de traitement mais 51% reste cependant dans le grua (Wood, 1982).

La désactivation thermique a été testée, mais celle-ci est d'une efficacité limitée pour l'élimination de l'OTA. Le traitement du blé, en conditions humides, pendant 145, 60 et 19 minutes respectivement à 100, 150, et 200°C permet de réduire de moitié le taux d'OTA (Boudra *et al*, 1995). L'élimination de l'OTA nécessite un passage à des températures élevées, pendant des durées relativement longues. Il a été montré que l'OTA est transformée en l'épimère 3-S suite au chauffage à des températures identiques à celles de la cuisson ou de la torréfaction (Suarez-Quiroz, 2004). Ce dérivé de l'OTA a un potentiel toxique *in vitro* réduit d'un facteur 10 par rapport à celui de l'OTA sur les activités mitochondriales et la synthèse protéique (Bruinink *et al*, 1997).

Les effets des irradiations ont également été étudiés. Les radiations gamma, appliquées sur la denrée contaminée, sont capables de nettement réduire la flore microbienne (El-Bazza *et al*, 2001 ; Aziz & Moussa, 2002). La présence d'*Aspergillus ochraceus*, ainsi que celle d'OTA consécutive à la contamination par ce champignon, sont totalement inhibées pour une dose de 4kGy. Une dose comprise entre 15 et 20 kGy permet la destruction de l'OTA présente dans l'aliment (Refai *et al*, 1996). L'application de ces radiations permet l'augmentation de la durée de conservation de la denrée traitée en la rendant moins susceptible aux contaminations par les moisissures (Nagy & Loufty, 2002). Un inconvénient de ces méthodes de traitement par radiations réside dans la réticence du public à l'utilisation de telles pratiques. De plus, celles-ci ont un coût élevé, et l'utilisation d'un tel traitement peut difficilement être réalisé sur le lieu de stockage ou de transformation des aliments.

Des méthodes biologiques sont également développées (pour une revue, voir Karlovsky, 1999).

En conclusion, des stratégies visant à limiter la contamination par l'OTA sont développées mais celles-ci ont une efficacité restreinte. Les méthodes de décontaminations physiques efficaces pour l'élimination de l'OTA, comme l'irradiation ont un coût élevé et leur développement pour la décontamination à grande échelle est délicat. Le procédé Oxygreen® peut être une solution à la problématique de contamination des céréales par l'OTA.

3.2.2.2 Le procédé Oxygreen® : une solution pour la décontamination en OTA des céréales ?

Le procédé Oxygreen® est un procédé développé, entre autres, pour la décontamination en mycotoxines des céréales. Celui-ci consiste en un traitement à l'ozone des grains contaminés en réacteur clos. Ce chapitre de l'introduction bibliographique a pour objet, d'une part de présenter l'ozone, ses caractéristiques chimiques, son potentiel décontaminant et son utilisation en agroalimentaire, et d'autre part, de présenter le potentiel du procédé Oxygreen® pour son utilisation en tant qu'auxiliaire technologique, mais également en tant que procédé décontaminant.

3.2.2.2.1 Le principe actif : l'ozone

3.2.2.2.1.1 Qu'est-ce que l'ozone

L'ozone est formé de 3 atomes d'oxygène. Sous les conditions normales de température et de pression, il se présente sous la forme d'un gaz bleuté sous forte épaisseur, instable, ayant une odeur acre caractéristique. Les principales caractéristiques physiques de l'ozone sont rappelées ci-après.

Le poids moléculaire de l'ozone est de 48 g/mol, son point de liquéfaction est atteint à -112°C et son point de solidification à -192,7°C, sous une pression de 1 atmosphère (The Merck Index, 1989). Sa masse volumique, à 0°C sous une pression de 1 atmosphère, est de 2,15 g/l. Le potentiel d'oxydation de l'ozone est élevé (-2,07V), comparé à celui d'autres oxydants tel que le chlore (-1,36V). L'ozone est soluble dans l'eau ; des facteurs tels que la température ou le pH joueront sur sa solubilité.

3.2.2.2.1.2 La réactivité de l'ozone

L'ozone présente deux types de réactions qui sont directement liées au pH du milieu réactionnel.

A pH acide, les réactions de l'ozone sont préférentiellement de type moléculaire, en absence de promoteurs de radicaux libres. A pH basique, les réactions de l'ozone sont préférentiellement de type radicalaire.

Les réactions de l'ozone varient aussi en fonction de la nature du milieu (liquide, gaz, solide, ou tixotrope c'est-à-dire en milieu ni vraiment solide, ni vraiment liquide comme la pâte à papier)

- Comportement de l'ozone dans l'eau

En milieu liquide, les réactions ont lieu après transfert de l'ozone gazeux dans ce milieu. Le transfert s'effectue par dissolution de l'ozone, sous forme de bulles, et passage de l'ozone au travers de l'interface gaz-liquide. Deux types de réactions peuvent être envisagées:

- les réactions rapides (cinétique du premier ordre) qui ont lieu à l'interface gaz-liquide,
- les réactions semi-rapides ou lentes (cinétique du deuxième ordre), qui n'ont pas lieu à l'interface gaz-liquide, et qui dépendent de la diffusion de l'ozone dans le milieu réactionnel, ainsi que de la nature du réactif.

La stabilité de l'ozone dissout en milieu liquide dépend fortement du pH et de la température du milieu. La lumière ultraviolette incidente peut également avoir un effet sur la stabilité de l'ozone dissout en milieu liquide. La concentration de l'ozone dans la phase dissoute, ainsi que la présence éventuelle d'inhibiteurs, de propagateurs ou d'initiateurs de radicaux libres en solution, peuvent avoir une incidence marquée sur la décroissance de la concentration d'ozone dissout ainsi que sur sa durée de vie (Tomiyasu & Fukutomi, 1985). Le rôle de la température du milieu réactionnel, bien que modéré entre 15 et 35 °C, devient prépondérant au delà de ces températures (Pan & Chen 1984 ; Parthasarathy & Peterson 1990). Un exemple de réaction possible de l'ozone, en phase liquide, est décrit dans le modèle ci-après développé par Hoigne & Bader (1976, 1978).

En solution liquide, l'ozone peut se décomposer, avant de réagir avec le milieu réactionnel. Cette décomposition conduit à la formation d'espèces plus réactives, généralement de types radicalaires. Divers travaux ont permis de démontrer que la décomposition de l'ozone résultait d'une réaction en cascade, dans laquelle l'ion hydroxyde joue le rôle d'initiateur. Les espèces radicalaires, formées au cours de la réaction, initient la réaction en cascade. L'ozone peut donc, soit réagir directement sur les molécules présentes en solution ou, au delà d'une valeur critique du pH, se décomposer. Dans ce dernier cas, les espèces issues de la décomposition de l'ozone dans le milieu liquide, telles que le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$) peuvent devenir les agents oxydants. Le pH du milieu réactionnel est dépendant des réactions primaires ayant lieu avec les molécules initialement présentes dans le milieu réactionnel, puis secondairement, des réactions de l'ozone avec les sous-produits des réactions primaires (Hoigne & Bader 1976; Hoigne & Bader 1978).

En présence de molécules réactives à l'ozone, le radical hydroxyle, généré suite à la décomposition de l'ozone, pourra réagir avec celles-ci. A partir de là, la réaction peut évoluer de différentes façons, dépendantes de la nature de ces molécules (Staehelin & Hoigné, 1985).

- Réactivité de l'ozone moléculaire

L'ozone peut agir, soit comme un agent d'addition 1,3-dipolaire (Huisgen, 1963), soit comme un réactif électrophile (Meinwald, 1955) ou nucléophile (Langlais & Reckhow, 1985).

- Réaction de cyclo-addition (mécanisme de Criegee)

Pour rendre compte de la réaction de cyclo-addition, la structure dipolaire de l'ozone doit être envisagée. Cette réaction peut intervenir au niveau des liaisons insaturées des molécules. La réaction d'addition 1,3-dipolaire peut également concerner une liaison carbone-hydrogène, activée ou non. Une liaison est dite activée si l'état de transition, au cours de l'ozonation, est fortement stabilisé par un groupe donneur d'électrons tel qu'un groupe hydroxyle, alkoxy- ou amino-. Les molécules concernées sont donc les alcools, les éthers, les aldéhydes et les amines. Les composés ne comportant pas de liaison activée sont les alcanes et les cyclo-alcanes. Ce mécanisme de cyclo-addition peut conduire à la formation d'ozonides réactifs.

- L'attaque électrophile

L'attaque électrophile peut avoir lieu sur des molécules à forte densité électronique, telles que les composés aromatiques, possédant un substituant donneur d'électron, et, conduisant à la formation de quinone, et ou telles que les oléfines qui peuvent être époxydées.

- La réaction d'auto-oxydation

Deux mécanismes ont été proposés pour l'oxydation de liaisons carbone-hydrogène ; l'un correspond à une addition 1,3-dipolaire (Bach & Su, 1994), l'autre à une réaction de type radicalaire

avec initiation par l'ozone d'une auto-oxydation (Schubert & Pease, 1956). Cette réaction radicalaire est une réaction en cascade dont l'ozone est le précurseur et dont l'oxygène est l'oxydant.

- L'attaque nucléophile

Prévue par la théorie, l'attaque de l'ozone sous la forme d'un di-radical a été observée lors de l'oxydation de composés possédant un déficit électronique (Langlais & Reckhow, 1985).

3.2.2.2.1.3 L'utilisation industrielle de l'ozone

La découverte des propriétés bactéricides de l'ozone par Ohlmühler, en 1890, a été à l'origine de sa production industrielle. Afin d'obtenir les quantités d'ozone nécessaires à son utilisation industrielle, diverses méthodes de production de l'ozone ont été développées.

- Production industrielle de l'ozone

Les brevets les plus innovants concernant les méthodes de production de l'ozone ont été répertoriés par Miller *et al*, 1998. Les trois principales méthodes utilisées sont les méthodes électrochimiques, les méthodes par radiations ultra-violettes et les méthodes de décharge électriques. C'est cette dernière méthode qui est utilisée pour la production de l'ozone dans le cadre du procédé Oxygreen®

Dans cette méthode, l'oxygène pur, ou un gaz vecteur contenant de l'oxygène, traverse un espace entre deux électrodes séparées par un matériel di-électrique (Figure 5). Les électrodes sont, en général, des tubes concentriques métalliques ou des électrodes plates, qui sont connectés à une source d'électricité alternative. Quand un voltage alternatif est imposé aux deux électrodes, une décharge de type couronne, se crée entre les deux électrodes, et l'oxygène présent dans l'espace de décharge est converti en ozone. Les molécules d'O₂ sont dissociées en deux atomes d'oxygène, lesquels se recombineront pour générer une molécule d'O₃.

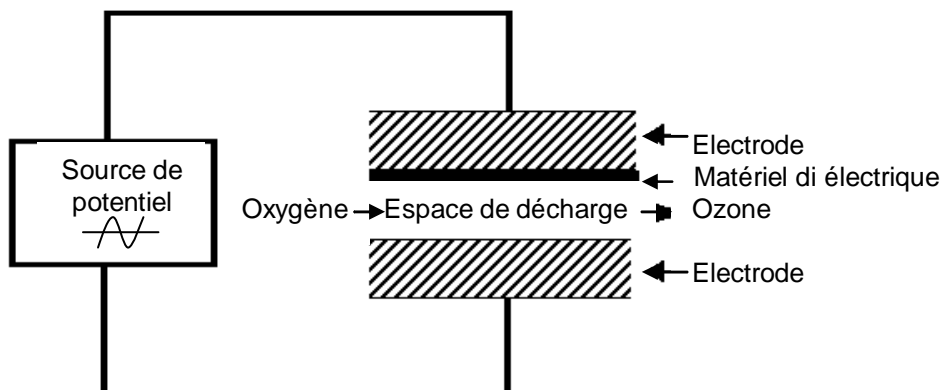


Figure 5. : Système de production d'ozone par décharge électrique

L'arc électrique génère une production de chaleur qui peut aboutir à une décomposition de l'ozone si celle-ci n'est pas contrôlée. Afin d'empêcher ce phénomène, les ozoneurs, utilisant les méthodes de décharges électriques, sont équipés d'un système de refroidissement. Celui-ci doit permettre l'obtention d'une température du gaz dans l'espace de décharge compatible avec la génération maximale d'ozone. Cette température doit être suffisamment basse pour qu'il n'y ait pas de décomposition de l'ozone. Ce refroidissement est, en général assuré par une circulation d'eau ou d'air, à la surface des électrodes, de façon à ce que la chaleur générée par la décharge soit absorbée par le fluide de refroidissement.

- Domaines d'utilisation industrielle de l'ozone

Actuellement, l'ozone est utilisé dans de multiples domaines, notamment l'agriculture, l'alimentation, l'industrie du papier, la chimie, la chimie fine, la pharmacie, et les cosmétiques ; néanmoins, son utilisation majeure consiste encore dans le traitement de l'eau.

L'ozone a suscité un intérêt industriel particulier suite à la découverte de ses propriétés bactéricides, et a été utilisé pour accroître la qualité microbiologique de divers produits alimentaires (Kim, 1998 ; Kim *et al*, 1999). Le spectre antimicrobien de l'ozone, est détaillé ci-après.

- *Le spectre antimicrobien de l'ozone*

L'action antimicrobienne de l'ozone a été mise en évidence sur de multiples bactéries. L'ozone a la capacité d'inhiber le développement des bactéries, que celles-ci soient sous forme végétative ou à l'état de spores, bien que la forme sporulée soit un peu plus résistante (Broadwater *et al*, 1973). L'inactivation dépend de la concentration en ozone, ainsi que du temps de contact appliqué. L'ozone inhibe le développement par exemple de *Bacillus sp* (Broadwater *et al*, 1973 ; Khadre & Yousef, 2001), *E. coli* (Joret *et al*, 1982 ; Restaino *et al*, 1995), *Salmonella sp* (Ramirez *et al*, 1994 ; Restaino *et al*, 1995), de *Listeria monocytogenes* (Wade *et al*, 2003 ; Restaino *et al*, 1995) ou *Staphylococcus aureus* (Burleson *et al*, 1975). L'utilisation de co-traitements, comme l'utilisation de radiations UV, de pH acides, l'addition d'acide ascorbique (Naitoh, 1992) ou l'utilisation conjointe d'ultrasons (Burleson *et al*, 1975) augmentent l'efficacité antibactérienne de l'ozone.

L'ozone a aussi une activité antifongique ; il pourra inhiber le développement des levures ou des moisissures, ces dernières étant plus résistantes (Restaino *et al*, 1995). L'effet fongicide de l'ozone a été mis en évidence, que le champignon soit sous forme micellaire ou sous forme de spore (Allen *et al*, 2003). Cet effet fongicide, notamment démontré sur le type *Fusarium*, testé sur l'orge, peut être accru en faisant varier le taux d'humidité de l'orge et sa température (Kottapalli *et al*, 2005).

L'action antimicrobienne de l'ozone est dépendante de facteurs environnementaux, ainsi que de l'état physiologique des microorganismes. La sensibilité des microorganismes variera en fonction du pH, de la température, de l'humidité et de la présence de molécules organiques dans le milieu (Leiguarda *et al*, 1949 ; Herbold *et al*, 1989). L'humidité relative est particulièrement importante : l'activité bactéricide de l'ozone est quasiment nulle pour des taux d'humidité relative inférieurs à 45%, alors que l'inhibition bactérienne est très élevée quand le taux d'humidité atteint 85 à 95% (Elford & Ende, 1942 ; Ewell, 1946). Par ailleurs, l'ozone réagit avec les molécules présentes dans l'environnement traité, ceci limitant l'efficacité du traitement. C'est pourquoi, le taux d'élimination de la population de *Salmonella spp* est nettement plus important quand les bactéries sont placées dans de l'eau distillée (Dave *et al*, 1998) par rapport au taux d'élimination observé lors du traitement de carcasses de poulet contaminées (Ramirez *et al*, 1994). De même, l'application de l'ozone sur le lait permet de diminuer la population bactérienne, mais avec une efficacité inférieure à celle observée en absence de matière organique (Moore *et al*, 2000). Restaino *et al*. constatent que le potentiel bactéricide de l'ozone sur des populations de *Salmonelles* et d'*E. coli* n'est pas modifié en présence d'amidon ; il est par contre réduit par la présence dans le milieu d'albumine sérique bovine (Restaino *et al*, 1995). Castillo *et al*. ont montré, quand à eux, que des populations de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli* O157:H7 n'étaient pas éliminées de carcasses de bœuf, de manière plus efficace par un traitement à l'ozone que par un simple lavage de la viande à l'eau (Castillo *et al*, 2003). L'efficacité de l'élimination de bactéries (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ou *Pseudomonas fluorescens*) par l'ozone est réduite quand celles-ci sont présentes dans des effluents (Burleson *et al*, 1975). La présence de matière organique, avec laquelle l'ozone peut réagir, déterminera le potentiel décontaminant de l'ozone ; la nature de la matière organique présente dans le milieu a également son importance. Des temps de contacts plus longs sont nécessaires pour obtenir le même taux d'élimination des bactéries présentes dans des effluents et de celles présentes en solution saline (Burleson *et al*, 1975).

L'efficacité de l'ozone, en temps qu'agent antimicrobien, dépendra de la quantité d'ozone appliquée, mais également de celle disponible n'ayant pas réagi avec la matrice (Kim, 1998). La présence d'albumine, par exemple, dans le milieu réduit sensiblement l'efficacité bactéricide de l'ozone (Yang & Chen, 1979 ; Restaino *et al*, 1995). Ces propriétés fongicides et bactéricides ont trouvé leur utilisation dans le domaine agroalimentaire.

- *Utilisation dans le domaine agroalimentaire, en contact direct avec l'aliment*

Depuis 1982, l'utilisation de l'ozone, pour le traitement de l'eau en bouteille, est admise aux Etats-Unis avec des restrictions spécifiques (FDA, 1982). Récemment, un comité d'experts a affirmé

que l'ozone était une substance « GRAS » (« Generally Recognised As Safe ») pour de larges applications alimentaires (Graham, 1997). La FDA, « Food and drug administration », n'a pas émis d'objection vis-à-vis de cette affirmation, ce qui fait que l'ozone, en phase gazeuse ou aqueuse, peut être utilisé comme désinfectant dans l'industrie agroalimentaire aux Etats-Unis, et peut être utilisé pour des applications en contact direct avec la nourriture. Dans l'agroalimentaire, l'ozone présente un potentiel d'utilisation pour l'amélioration du stockage de produits alimentaires tels que les fruits et les légumes, la viande, le poisson ou le fromage, ainsi que pour le lavage et l'assainissement des denrées présentant une surface intacte et lisse (pour une revue, voir Kim *et al*, 2003)

Les applications les plus récentes de l'ozone, dans le domaine agroalimentaire, concernent la conservation des aliments, la désinfection, ainsi que le ralentissement des processus de maturation des fruits et des légumes. Le stockage des pommes, dans une chambre froide à 0°C et 95% d'humidité relative, dans laquelle est appliqué un flux d'ozone (5 à 6 µg/l) à raison de 4 heures par jour, permet de réduire la détérioration des fruits et de limiter leur perte de poids (Bazarova, 1982). De même, des essais d'ozonation sur des oignons, des pommes de terres, des raisins, ou des betteraves, permettent de réduire les contaminations bactériennes, de diminuer les pertes liées à la détérioration des aliments, et d'augmenter la durée de conservation de l'aliment (Faitel'berg-Blank *et al*, 1979 ; Baranovskaya *et al*, 1979 ; Sarig *et al*, 1996). L'ozone est également utilisé dans l'air ambiant, pour retarder la maturation des fruits. L'éthylène, agent de maturation des fruits et des plantes, est oxydé en CO₂ et H₂O par l'ozone. Cette diminution de la concentration en éthylène dans l'air de la chambre froide, a pour effet un accroissement de la durée de conservation de l'aliment, par ralentissement de sa maturation (Horvath *et al*, 1985).

Des essais, menés sur des aliments secs, ont également montré que l'on pouvait réduire de façon très nette la charge microbienne de ce type d'aliment (Naitoh *et al*, 1988). Des essais sur les cacahuètes et sur le coton ont montré l'aptitude de l'ozone à détruire les aflatoxines présentes sur ces matrices alimentaires (Dollear *et al*, 1968 ; Dwarakanath *et al*, 1967). L'utilisation de faibles concentrations d'ozone, au cours de l'affinage du fromage, permet d'augmenter la durée de conservation de celui-ci (Horvath *et al*, 1985) et d'inhiber le développement des spores des moisissures (Shiler *et al*, 1978). L'application d'ozone (5 à 7 µg/l) à raison de 4 heures tous les 2 à 3 jours, empêche le développement de moisissures sur le fromage, ainsi que sur le matériel d'emballage, et ce, sans avoir d'effet néfaste, ni sur la composition chimique, ni sur le goût du fromage (Gabriel'yants' *et al*, 1980). Serra *et al*, constatent cependant, que seules les moisissures présentes dans l'espace aérien de la chambre d'affinage sont éliminées, alors que celles présentes sur les surfaces survivent à un traitement à l'ozone (Serra *et al*, 2003).

Le lavage du poisson vidé, par une solution saline ozonée pendant 30 à 60 minutes, permet de nettement diminuer le nombre de bactéries viables, et augmente la durée de conservation du poisson de 20 à 60% quand le traitement est répété tous les deux jours (Haraguchi *et al* 1969). De plus, l'utilisation de l'ozone, combinée à un stockage au froid, permet d'augmenter la qualité gustative du poisson en diminuant la formation de triméthylamine (Dondo *et al*, 1992). Récemment, l'intérêt de l'utilisation de blocs de glace ozonée, a été démontré pour la conservation du poisson (Campos *et al*, 2006).

La conservation de la viande ou des œufs, est également accrue suite à l'utilisation de l'ozone. Le traitement à l'ozone de la viande permet de réduire la charge bactérienne, et d'augmenter la durée de stockage de 30 à 40% (Kolodyaznaya & Suponina, 1975). Ce traitement, réalisé par de l'eau ozonée, s'avère plus efficace que d'autres traitements comme celui à l'acide acétique ou comme l'utilisation de désinfectants commerciaux (Reagan *et al*, 1996). Sur les œufs, la population bactérienne est également nettement réduite, suite au traitement à l'ozone, cependant une réduction du potentiel des œufs à éclore est observée (Whistler & Sheldon, 1989).

L'ozone a également été testé pour la décontamination bactérienne des surfaces (Li & Wang, 2003), des équipements ainsi que des emballages.

- Intérêt et limites de l'utilisation de l'ozone

L'ozone a démontré une efficacité supérieure à celle du peroxyde d'hydrogène pour l'élimination par exemple de *Bacillus sp.* (Khadre & Yousef, 2001). Les *Fusaria*, présents sur l'orge, sont éliminés avec une efficacité plus élevée par un traitement au peroxyde d'hydrogène par rapport au

traitement à l’ozone (Kottapalli *et al*, 2005). L’ozone présente une activité antibactérienne, vis-à-vis des spores, des micro-organismes fécaux, des pathogènes et des virus, plus élevée et plus rapide que celle du chlore, et ce, particulièrement quand l’environnement est riche en matière organique (Gomella, 1972). Une étude, menée par Kessel *et al*, montre que l’ozone a un taux de désinfection vis-à-vis du poliovirus supérieur à celui du chlore, résultats confirmés ultérieurement par Scarpino *et al*. (Kessel *et al*, 1943 ; Scarpino *et al*, 1972). Lors du traitement des eaux usées ou des eaux de boisson, l’ozone présente l’avantage de ne pas rester présent dans l’eau traitée, de ne pas provoquer l’apparition de composés organo-chlorés et de ne pas laisser de mauvais goût en ce qui concerne l’eau potable. Le traitement à l’ozone génère des produits dérivés nocifs en quantité moins importante que celle générée lors de la chloration (Andrzejewski *et al*, 2005 ; Guay *et al*, 2005). La molécule d’ozone se décompose spontanément en oxygène, ce qui limite l’accumulation de déchets inorganiques dans l’environnement (Horvath *et al*, 1985).

Cependant, une étude semble indiquer que les produits générés suite à la désinfection par le chlore ou par l’ozone ont un potentiel génotoxique similaire (Sujbert *et al*, 2006). Afin de pallier cet effet toxique, des traitements combinés sont proposés pour limiter la formation de ces produits génotoxiques suite à l’ozonation, tels qu’une filtration préalable des effluents (Guay *et al*, 2005 ; Karnik *et al*, 2005). Lors de l’utilisation dans le domaine agroalimentaire, une oxydation de la surface de l’aliment traité peut avoir lieu si la concentration en ozone utilisée est trop élevée (Rice *et al*, 1982). Fournaud & Lauret signalent une décoloration, ainsi que la génération d’une odeur indésirable, sur la viande traitée à l’ozone (Fournaud & Lauret, 1972). L’ozone modifie également la couleur de certains fruits ou légumes, comme les pêches, les carottes ou le brocoli (Lewis *et al*, 1996 ; Liew & Prange, 1994). Enfin, l’ozone peut avoir un effet négatif sur la qualité gustative du produit traité, comme observé sur les épices (Zagon *et al*, 1992) ou le lait en poudre (Ipsen, 1989). Une amélioration du côté gustatif a tout de même été observée dans certains cas, notamment avec les œufs ou le bœuf (Dondo *et al*, 1992 ; Bailey *et al*, 1996). Ainsi, les altérations des propriétés gustatives de l’aliment traité dépendent de la composition chimique de celui-ci, de la dose d’ozone appliquée et de la durée du traitement. D’un point de vue toxique, l’ozone est un irritant des yeux et des poumons. Thorp a déterminé des seuils limites d’exposition de l’homme à l’ozone, correspondant à des effets nocifs croissants. Ainsi, il a défini des effets symptomatiques, des effets irritants, des effets nocifs ou des effets létaux pour des expositions aux concentrations respectives de 2, 4, 5 et 95ppm (Thorp, 1950). Des effets mutagènes de l’ozone ont pu être mis en évidence sur *E. coli*, exposée 5 minutes à une concentration d’ozone dans l’air de 0,05ppm (Hamelin & Chung, 1975). Les effets mutagènes de l’ozone ont été suggérés sur les plantes (Fetner, 1958) et sur l’animal (Stockinger, 1962).

Aux Etats-Unis, dans l’environnement de travail, la concentration maximale en ozone admise est de 0,1ppm (CFR, 1997), alors que les résultats obtenus par l’étude de Razumovskii suggèrent une concentration maximale admissible en ozone de 0,047ppm (Razumovskii & Zaikov, 1984). Ainsi, au vu des effets nocifs liés à l’inhalation de l’ozone, des systèmes de mesure de la concentration de l’ozone dans l’air ambiant, ainsi que des systèmes de destruction de l’ozone résiduel, doivent être mis en œuvre lors de l’utilisation industrielle de l’ozone. De plus, les conditions optimales de traitement, pour l’obtention du résultat souhaité, doivent être déterminées afin de ne pas utiliser de concentrations excessives d’ozone.

En France, l’ozone est un « produit auxiliaire soumis à autorisation » pour l’usage dans l’industrie agroalimentaire. L’AFSSA et la DGCCRF ont émis, en 1999, un avis favorable concernant l’utilisation de l’eau ozonée pour le lavage des végétaux crus (avis du 14 septembre 1999). Un avis de l’AFSSA de juillet 2003, étendu dans l’avis de septembre 2004, autorise l’utilisation de l’ozone sur le blé avant mouture en temps qu’auxiliaire technologique (AFSSA 2003-SA-055 et AFSSA 2004-SA-0161).

3.2.2.2 Développement du procédé Oxygreen®

L’ozone, appliqué sous forme dissoute en phase aqueuse ou par voie gazeuse, a plusieurs applications dans le domaine agroalimentaire comme présenté précédemment. Le procédé Oxygreen® offre des applications novatrices, pour l’utilisation de l’ozone dans ce domaine. Le procédé Oxygreen® a démontré sa capacité à détruire la flore bactérienne présente sur le blé, à détruire des

pesticides présents sur le blé, et à diminuer le taux en mycotoxines du blé. Les applications du procédé Oxygreen®, déjà validées, sont présentées ci-après.

3.2.2.2.1 Applications novatrices du procédé Oxygreen®

Il permet l'obtention de farines à caractéristiques technologiques particulières, l'augmentation de la digestibilité des substrats ligno-cellulosiques, ainsi que la diminution de la charge en mycotoxines des céréales. Plusieurs brevets ont été déposés. De nombreuses enveloppes Soleau ont été déposées pour l'utilisation de l'ozone sur des substrats ligno-cellulosiques.

- Brevets déposés

- Procédé et installation pour le traitement des semences et des bulbes

Method and system for the treatment of seeds and Bulbs

International patent classification: A01C 1/00

Brevet Français n° FR 9311776;

Date de dépôt: 10 octobre 1993

N° international filling: PCT/FR 9401153 ;

N° international publication WO 95/09523;

Date de publication internationale: 13 avril 1995

- Procédé et installation pour la fabrication de farines partir de grains traités à l'ozone

Method and installation for making flour from Ozone-treated grains

International patent classification: A23B 9/18

Brevet Français n° FR 9915955

Date de dépôt: 17 décembre 1999

N° international filling: PCT/FR 0003573.

N° international publication WO 01/43556;

International publication date: 18.12.00 (dec, 18th, 2000)

- Traitement de substrats ligno-cellulosiques par l'ozone

Treatment of lingo-cellulosic substrates with Ozone

International patent classification: A23K 1/12

Brevet Français n° FR 0108243

Date de dépôt: 22 juin 2001

N° international filling: PCT/FR02/02162

N° international publication WO 03/000070 A1

- Procédé pour le traitement à l'ozone de matières végétales

Device for ozone treatment of plant materials

International patent classification: B02B 1/04

Brevet Français n° FR 02845015

Date de dépôt : 27 septembre 2002

N° international filling: PCT/FR 03/02831

N° international publication: WO 2004/028695 A1

International publication date: 08/04/04

- Procédé de pétrissage de pâtes à base de farine de blé tendre, réalisé en présence d'ozone.

En procédure PCT – Mars 04

- Facilité de mise en place du procédé Oxygreen® : insertion dans le diagramme meunier

Ce procédé présente l'avantage de pouvoir s'insérer facilement dans le diagramme meunier, permettant l'obtention de farines issues d'un blé ozoné, ayant des propriétés microbiologiques et technologiques améliorées.

Contrairement à d'autres procédés, comme le traitement au chlore, l'application de l'ozone ne laisse pas de résidu sur le grain traité. Il a été montré qu'il ne persistait aucune molécule d'ozone résiduel après traitement des grains sur les grains eux-mêmes, ou dans l'espace interstitiel. Le procédé Oxygreen® peut être mis en œuvre, au niveau du moulin, lieu de transformation des céréales. Il ne nécessite pas d'intercaler d'étapes supplémentaires, hormis l'ozonation, dans le procédé de fabrication de la farine. L'humidification du blé, requise pour l'efficacité de l'ozonation, est déjà une étape présente dans le diagramme meunier avant le broyage des grains. Le procédé Oxygreen® peut s'intercaler dans le diagramme meunier, après les étapes classiques de nettoyage des grains. Le positionnement du procédé dans le diagramme meunier est présenté sur la figure 6 ci-dessous.

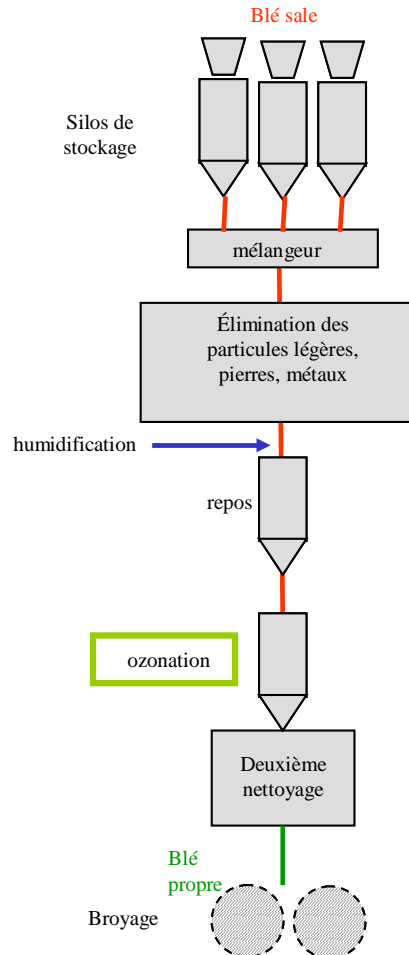


Figure 6. : modèle d'insertion du traitement Oxygreen® dans le diagramme meunier

Les grains stockés dans différents silos seront mélangés avant d'être soumis à la première étape de nettoyage, consistant en une élimination par soufflage des particules les plus légères. Ces grains seront ensuite humidifiés, de telle sorte que l'humidité du grain soit optimale pour procéder à la mouture, soit 18% d'humidité pour la mouture du blé. Les grains humidifiés sont soumis à une étape de repos, comprise entre 8 et 36 heures, avant d'être soumis aux autres étapes de nettoyage qui vont permettre de récupérer notamment les enveloppes des grains utilisées en alimentation animale. Ces étapes classiques de traitement du grain avant mouture sont conservées lors du traitement par le procédé. Celui-ci sera appliqué juste après la phase de repos des grains humidifiés, ou après la seconde étape de nettoyage, avant mouture. La pré-humidification des grains pourra être réalisée avec de l'eau ozonée. A la sortie du moulin, le meunier fournit une farine issue d'un blé ozoné et présentant un haut niveau de sécurité ainsi que des propriétés technologiques intéressantes.

3.2.2.2.1 Le procédé Oxygreen® pour l'obtention de farines à haut niveau de sécurité alimentaire

- Potentiel d'élimination des microorganismes et résidus de contaminants

L'ozone, appliquée dans le contexte du procédé Oxygreen®, conserve les propriétés bactéricides ou fongicides décrites précédemment. Le premier domaine d'application du procédé Oxygreen® consiste en l'obtention de farines à haut niveau de sécurité alimentaire. L'utilisation du procédé Oxygreen®, sur le blé pré-humidifié, a permis d'obtenir une nette amélioration de la qualité microbiologique de celui-ci. En outre, le procédé Oxygreen® permet la destruction des insecticides de stockage (le malathion, le pyrimiphosméthyl et la deltaméthrine). L'utilisation du procédé Oxygreen® semble démontrer une efficacité pour la destruction de certaines mycotoxines dont le déoxynivalénol, ou l'OTA.

Les conditions de traitement, nécessaires à l'obtention de ces résultats, ainsi que la description détaillée du réacteur, sont décrits dans le brevet N° 99.15995, déposé le 15 décembre 1999 par la société GREEN TECHNOLOGIES SARL et ayant pour objet le « Procédé et installation pour la fabrication des farines présentant un haut niveau de sécurité alimentaire ».

- Le procédé Oxygreen® en temps qu'auxiliaire technologique

- Obtention de substrats destinés à l'alimentation animale et ayant un haut degré de digestibilité

Ce procédé est proposé pour le traitement de multiples substrats ligno-cellulosiques, tels que la paille de seigle, de blé, ou de luzerne, les cossettes de betterave et de céréales. La capacité de traitement par ce procédé peut atteindre plusieurs dizaines de tonnes par heure.

Il a fait l'objet du brevet N° 01 08243 : « le traitement de substrats ligno-cellulosiques à l'ozone », qui décrit les paramètres de l'ozonation. Celui-ci doit permettre l'obtention de substrat ligno-cellulosiques à haute digestibilité, destinés à l'alimentation animale.

- Obtention de farines ayant des propriétés technologiques particulières

Le procédé Oxygreen® peut être mis en œuvre pour l'obtention de farines dites « technologiques » à partir de blé tendre. Il s'agit de farines dont les propriétés physiques ou chimiques sont modifiées, et dont le nouveau caractère correspond à une demande dans les industries de panification ou de pâtisseries.

Différentes qualités de la farine, décrites ci-après, sont recherchées par les industriels. Il s'agit par exemple d'obtenir une farine s'hydratant de façon accélérée, et ce, afin de répondre à la demande des producteurs de pains surgelés, qui utilisent des procédés de pétrissage de plus en plus rapides. Les propriétés mécaniques des pâtes sont déterminantes pour la formation et la structure du produit fini après cuisson. Ces propriétés concernent la ténacité, l'extensibilité, la tolérance, la machinabilité, ainsi que la porosité de la pâte. La ténacité et l'extensibilité de la pâte déterminent le développement du pain, ainsi que sa structure après cuisson, mais influencent également la facilité du pétrissage et du façonnage. La tolérance et la machinabilité font référence à l'adaptabilité de la pâte à différents procédés de fabrication. Enfin, la porosité concerne la structure alvéolaire du produit, qui a une importance notoire sur son développement et son comportement au cours de la cuisson. Enfin, l'activation de certaines enzymes, présentes naturellement dans la farine, peut présenter un atout, en permettant de contrôler la coloration du produit (intervention de la polyphénol oxydase et de la lipoxygénase) ainsi que d'améliorer la durée de conservation des farines (intervention des lipases).

Ces qualités, recherchées par l'industrie du pain et de la pâtisserie, sont actuellement atteintes par l'ajout d'additifs, tels que l' α -amylase pour l'obtention d'un meilleur volume de produit, d'une meilleure hydratation de la farine et d'un rassissement du produit fini réduit. L'ajout d'acide ascorbique modifie la ténacité de la pâte. Le procédé Oxygreen®, appliqué sur un grain humidifié, et après un temps de repos déterminé, permet d'accroître la ténacité de la pâte et d'en réduire l'extensibilité. Le temps de repos à respecter après l'humidification des grains est de 24 heures minimum, et ce afin que les micropores du grains soient dilatés et hydratés, et que l'action de l'ozone puisse avoir lieu en profondeur. L'utilisation de faibles doses d'ozone conduit à une augmentation de la ténacité de la pâte, ainsi qu'à une réduction de l'extensibilité, effets similaires à ceux obtenus par l'addition d'acide ascorbique dans les farines. Quand la dose d'ozone appliquée est accrue, les pâtes

deviennent plus tenaces, mais également légèrement plus poreuses, ce qui présente un atout pour la confection des cakes anglais et des génoises. Enfin, l'inactivation de la lipase par l'ozone permet une meilleure évolution de la farine dans le temps, et ce, étant lié à l'absence d'oxydation des acides gras.

L'ozone peut également être appliqué sur le blé dur, utilisé pour la fabrication des pâtes et semoules. Dans ce cadre d'utilisation, l'ozone présente un avantage en inhibant l'activité de la lipoxigénase, ainsi que celle de la polyphénol oxydase. Ces deux enzymes sont responsables respectivement du blanchissement et du brunissement des semoules au cours du temps, caractères rédhibitoires des semoules pour le consommateur.

Les conditions d'application du procédé Oxygreen®, permettant l'obtention de ces caractéristiques particulières, sont décrites dans le brevet N° 02 11 970 déposé le 27 septembre 2002 par GREEN TECHNOLOGIES SARL et décrivant un « Procédé pour le traitement des matières végétales ».

Matériel et Méthode

1. Matériel et description des principaux tests réalisés au cours de l'étude in vitro

1.1 Description des cultures cellulaires utilisées

1.1.1 Produits utilisés

Les cellules rénales humaines (HK-2), et les cellules épithéliales bronchiques humaines WI (26VA4), ont été obtenues chez ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA).

Les milieux de croissance utilisés pour les cultures cellulaires sont les suivants:

- le milieu de croissance appelé « *RPMI* » ('Roswell Park memorial Institute', milieu 1640 contenant des sels organiques, des acides aminés, des vitamines, du D-glucose, du glutathion, du phénol et du bicarbonate de sodium avec L-Glutamine et 24 mM d'HEPES) pour les cellules WI,
- le milieu *Eagle's minimum essential medium* (D-MEM avec 1000mg/l de D glucose et complémenté par 2μM de glutamine) pour les cellules HK2.

Ces milieux, ainsi que le tampon phosphate salin (PBS) et la trypsine, ont été obtenus chez Invitrogen Life-Technologies (Cergy Pontoise, France). Le tampon PBS est constitué de KCl 0.2 g/l, KH₂PO₄ 0,2g/l, NaCl 8g/l, Na₂HPO₄ 1,15g/l, pH 7,4. La solution de trypsine 10X est constituée de Trypsine (0,05%)-EDTA (0.53 mM).

Le milieu nutritif est complémenté par 10 % de sérum de veau fœtal apportant des facteurs mitogènes, nécessaires à la division cellulaire, et par 1% d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline) fournis par Life-Technologies (Cergy Pontoise, France). Les consommables proviennent du laboratoire Becton Dickinson. Le diméthyl sulfoxyde (DMSO) provient de chez Sigma (France).

1.1.2 Conditions de culture

1.1.2.1 Mise en culture des cellules

Les souches cellulaires sont conservées dans de l'azote liquide dans un milieu de congélation.

A leur sortie de l'azote liquide, les cellules restent une minute à température ambiante avant d'être portées à 37 °C, une minute dans un bain-marie. Dix ml de milieu de culture, complémenté en SVF et antibiotiques (10 % de sérum de veau fœtal, 1% de pénicilline/streptomycine), préalablement chauffé à 37 °C, est placé dans une flasque de 75 cm³. Le ml de milieu de congélation, contenant les cellules, est ajouté dans la flasque. La flasque est placée une nuit à 37°C pour que les cellules adhèrent au support. Le lendemain, le milieu de culture de la flasque est remplacé afin d'éliminer les restes de DMSO qui étaient présents dans le milieu de congélation des cellules. Au bout de trois jours, le milieu de culture est épuisé et les cellules sont à confluence. Il est nécessaire d'effectuer un passage, ou repiquage des cellules, pour maintenir la viabilité de celles-ci et l'état de la culture. Cette opération permet l'amplification de la culture cellulaire.

1.1.2.2 Amplification de la culture cellulaire

Cette étape consiste à réduire le nombre de cellules contenues dans les boîtes, afin de leur permettre de poursuivre leur développement correctement. Pour les cellules HK2, le repiquage est effectué à 80% de confluence. Le milieu de culture est aspiré et la flasque est rincée à deux reprises avec du PBS. Ceci a pour but d'éliminer les traces de SVF, inhibiteur de la trypsine. Un ml de trypsine à 1X pour les cellules HK-2 et à ½ X pour les cellules WI, préalablement chauffée à 37°C, est ajouté dans chaque flasque afin de décoller le tapis cellulaire. La flasque est placée à 37°C pour favoriser l'activité enzymatique de la trypsine. Quand la dissociation du tapis cellulaire est visible à l'œil nu, la trypsination est stoppée par addition dans la flasque de 5ml de milieu de culture complet. Le surnageant, contenant les cellules, est récupéré et centrifugé 10 minutes, à 1400 rpm, à 4 °C. Les cellules culottées sont remises en suspension dans la quantité de milieu nécessaire à l'obtention d'une solution de 10⁶ cellules/ml environ. La suspension cellulaire obtenue est répartie dans différents flacons, à raison de 1ml par boîte, auxquels sont ajoutés 10 millilitres de milieu de culture.

Les cellules WI ont une croissance rapide, elles sont repiquées tous les trois jours. Les cellules HK-2, de croissance plus lente, sont repiquées tous les 5 jours.

1.1.2.3 Conservation des cellules

Les cellules à confluence d'une flasque sont décollées par trypsination (addition d'un millilitre de trypsine 1X pour les cellules HK-2 et de 1 ml de trypsine ½ X pour les cellules WI); elles sont culottées par centrifugation 11 minutes, à 4°C, 2400 rpm, puis le culot est remis en suspension dans 1 ml de milieu de congélation.

Le milieu de congélation est composé comme suit : il s'agit de milieu de culture, sans antibiotiques, complété avec 10% DMSO et 40% SVF pour les cellules HK-2 et WI 26.

Le ml de milieu de congélation, contenant les cellules, est disposé dans des tubes cryogéniques NALGENE, et est placé une nuit à -80°C dans une boîte de cryocongélation puis est mis dans l'azote liquide.

1.2 Etude de la cytotoxicité

1.2.1 Test au MTT

1.2.1.1 Produits et principe

Le test de prolifération est réalisé sur des plaques de 96 puits de chez Falcon, fournies par Becton Dickinson (Le pont de Claix, France). Le test de prolifération cellulaire utilisé (" Promega's Cell titer 96® non radioactive cell proliferation assay" distribué par Promega) est un test colorimétrique fondé sur l'activité métabolique des cellules viables. Ce test utilise des sels de Tétrazolium qui sont réduits métaboliquement par les cellules en un produit coloré : le Formazan. Ce composé absorbe à 570 nm. L'absorbance est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

1.2.1.2 Réalisation du test

Le protocole du test de cytotoxicité appliqué est celui recommandé par Promega.

Le tapis de cellules à confluence est détaché de la flasque par trypsination (addition de un ml de trypsine 1X, pendant 2 minutes à 37°C). La suspension cellulaire est centrifugée à 800g, pendant 10 minutes et 4°C. Le surnageant cellulaire est éliminé, et le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 ml de milieu. Les cellules sont dissociées grâce à des aspirations et reflux du milieu de culture. Quand la suspension est homogène, on ajoute 8 ml de milieu de culture. Les cellules, contenues dans une goutte de cette solution homogène, sont comptées sur « cellule de Mallassez ». Le comptage de 10 cellules par grand carré équivaut à une concentration d'un million de cellules par ml. Chaque puit de la plaque de prolifération cellulaire estensemencé par 5000 cellules contenues dans un volume de 90µl. On réalise la dilution de la suspension de cellules nécessaire pour avoir une concentration de 55555 cellules par ml de milieu de culture. On incube la plaque une nuit à 37°C pour que les cellules adhèrent. Le lendemain, on effectue le traitement voulu sur les cellules, en ajoutant dans chacun des puits 10µl de la solution à tester. La concentration en solvant dans le puit ne doit pas excéder 1%. Il est conseillé de faire au moins trois points pour le même traitement. On rajoute dans les puits témoins (100% de cellules viables), cellules non exposées, 10µl de milieu de culture. Par ailleurs, on réalise un blanc (DO_{blanc}) contenant uniquement 100µl de milieu de culture, sans cellules. Le traitement dure 24 ou 48 heures. Au terme de la stimulation, on ajoute dans chacun des puits 15 µL de la solution Dye, contenant les sels de Tétrazolium. On incube la plaque de prolifération cellulaire 4 heures à 37°C puis on ajoute dans chacun des puits 100µl de la solution stop qui va solubiliser le formazan. Les plaques sont placées la nuit à 37°C et le résultat est lu le lendemain : l'absorbance de chacun des puits de la plaque de prolifération cellulaire est déterminée à 570nm grâce à un lecteur de plaques 96 puits.

1.2.2 Test à la LDH

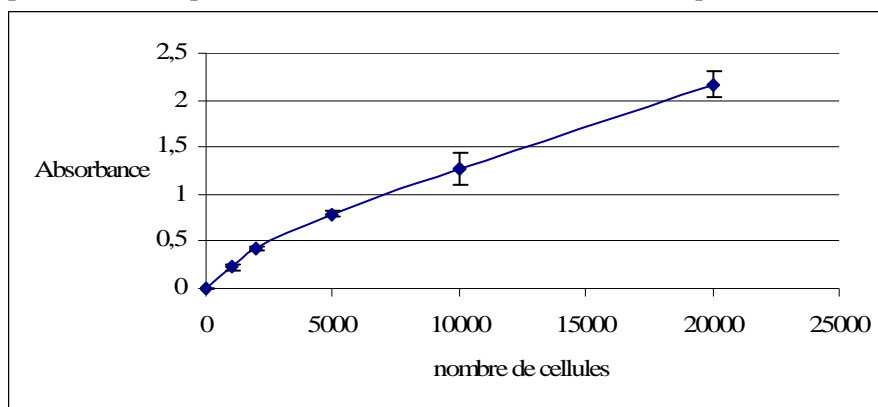
1.2.2.1 Produits et principe

La méthode de la lactate dèshydrogénase (LDH) permet d'évaluer la mortalité cellulaire en se basant sur la perméabilité membranaire des cellules exposées à l'agent toxique. La LDH est une

enzyme cytosolique stable qui est relarguée dans le milieu extracellulaire suite à une lyse cellulaire. Dans le test utilisé (CytoTox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, France), la quantification de la LDH extracellulaire s'effectue par une méthode enzymatique basée sur la transformation de sels de tétrazolium en formazan.

1.2.2.2 Réalisation du test

La première étape consiste à déterminer le nombre de cellules à ajouter dans les puits ; il est nécessaire d'adapter le nombre de cellules déposées dans chacun des puits, en fonction du type cellulaire utilisé, les cellules contenant des quantités variables de LDH. Pour cela, on réalise des dilutions de la suspension de cellules, et onensemence les puits avec 100µl de la suspension de cellules contenant des quantités croissantes de cellules. Pour chaque ensemencement, on fait trois ou quatre points. On ajoute 15µl de tampon de lyse 10X dans chacun des puits, on centrifuge à 250 g pendant 4 minutes et on place 45 à 60 minutes à 37°C. Cinq µl du surnageant sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits. On ajoute dans chacun des puits 50µl du mélange de substrat reconstitué, puis on incube 30 minutes à température ambiante et au noir. Cinquante µl de la solution stop sont ajoutés puis l'absorbance à 490 nm est lue. La détermination du nombre de cellules à ajouter dans chacun des puits doit permettre d'avoir un bon ratio signal/bruit de fond. Nous avons déterminé la quantité de LDH relarguée par les cellules WI, quand celles-ci sont lysées, en fonction du nombre de cellule présent dans le puits de culture. Les résultats obtenus sont présentés sur le graphe 3 ci-dessous.



Graph 3. : Evolution de l'absorbance suite à la lyse de la totalité des cellules WI ensemencées sur la plaque de prolifération, en fonction du nombre de cellules présentes.

Nous avons choisi pour nos expériences, d'ensemencer la plaque de prolifération cellulaire avec 5000 cellules par puits. Ceci nous permet de rester dans la gamme de lecture du lecteur de plaques, et nous permet d'avoir des conditions d'ensemencement comparables à celles utilisées avec le test de cytotoxicité au MTT.

Les puits de la plaque de prolifération cellulaire sont ensemencés avec 5000 cellules, contenues dans un volume de 90µl.

On réalise les témoins suivants :

DO_{nette 100% lyse} : témoin 100% de lyse dans lequel la totalité des cellules seront lysées par addition d'une solution de lyse

DO_{relargage spontané de LDH} : témoin relargage spontané de LDH par les cellules dans le milieu extracellulaire : ces puits, ensemencés avec le même nombre de cellules, ne sont pas exposés à une substance ; le volume est complété jusqu'à 100µl avec du milieu de culture.

DO_{solution à tester} : témoin d'absorbance de la solution testée : dans un puit ne contenant pas de cellules et 90µl de milieu de culture, on place 10µl de la solution à tester.

La plaque est placée une nuit à l'étuve afin que les cellules adhèrent au support. On ajoute 10µl de la solution à tester et place à incuber à 37°C, 5% CO₂ le temps voulu. 45 minutes avant la fin du traitement, ajouter 10µl de solution de lyse 10X (9% v/v Triton® X-100 dans de l'eau) dans les puits qui permettront de déterminer la quantité de LDH relarguée pour 100% de mort cellulaire. On corrige le volume dans chacun des puits témoins par addition de 10µl de milieu de culture.

Au terme du traitement, cinq μl de surnageant sont prélevés et transférés dans une nouvelle plaque 96 puits. On ajoute 50 μl de substrat et la réaction enzymatique se déroule pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par addition de 50 μl de solution stop (acide acétique 1M) et l'absorbance peut être lue à 490 nm sur un lecteur de plaques ELISA.

2. Etude *in vivo*

2.1 Contamination artificielle en OTA du blé et traitement Oxygreen®

La contamination artificielle en OTA du blé, ainsi que le traitement du blé par le procédé Oxygreen®, ont été réalisés par l'équipe du laboratoire Goëmar (Saint Malo, France).

Le blé utilisé pour la préparation des rations alimentaires destinées aux rats provenait d'un lot de blé meunier nettoyé ; celui-ci est soit non sur-contaminé en OTA (lots témoins, traités ou non par le procédé Oxygreen®) soit sur-contaminé aux taux annoncés de 2,5 , 7, 40 et 100 μg d'OTA/kg de blé. Pour obtenir une contamination homogène, l'OTA (fournie par Acros Organics, France) en suspension dans de l'éthanol, est injectée par une seringue sous pression dans un réacteur mélangeur contenant 9, 750 kg de blé. Pour tous les essais le volume injecté correspond à 1% de la masse de blé. Les lots traités par le procédé Oxygreen® en vue de leur décontamination ont été préparés dans les laboratoires de Goëmar (Saint Malo, France) sur une installation Oxygreen® Pilote. Les paramètres de l'ozonation du blé sont décrits dans le chapitre 1 des résultats. Les lots ont été ensachés sous vide par unités de 150 g et conservés à -20°C . L'évolution du taux de contamination en OTA du blé tout au long de l'expérience a été contrôlée.

2.2 Modèle animal et étude des paramètres physiologiques et biochimiques

2.2.1 Modèle animal et traitement des animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée avec des rats mâles et femelles de la race Dark Agouty, et a été mise en place par le CIT (« Safety and Health Laboratory », Evreux, France)

Les rats entrant dans notre étude étaient âgés de 7 semaines. Cependant, leur poids était compris entre 99 et 163 grammes en ce qui concerne les rats mâles et entre 95 et 118g en ce qui concerne les rats femelles. Cette hétérogénéité concernant le poids des animaux laisse supposer une hétérogénéité équivalente concernant leur âge. Après que ceux-ci aient subi un examen clinique attestant leur bon état de santé, ils ont été placés dans des cages individuelles de dimensions 43cm x 21,5cm x 20cm pendant une période de 20 jours d'acclimatation, à 22°C , avec des cycles jour/nuit de 12h/12 heures. Les cages des animaux des groupes témoins sont éloignées de celles des rats recevant un aliment contaminé en OTA.

Pendant les 28 jours d'expérimentation, 150 g de blé contaminé ou non en OTA, ont été mis à libre disposition des rats. La part d'aliment non ingérée a été pesée. L'eau de boisson a été filtrée sur filtre 0,22 μm et soumise à des analyses bactériologiques. Les rats ont été privés de nourriture 12 heures avant le prélèvement des échantillons de sang, et pendant la récolte des urines.

Chaque groupe de traitement est constitué de 5 rats mâles et de 5 rats femelles. Les différents groupes reçoivent les lots de blé décrits ci-dessous :

- groupe 1, ou groupe contrôle : groupe de rats « contrôle », recevant du blé non artificiellement contaminé en OTA
- groupe 2 : groupe de rats « contrôle Oxygreen® » recevant le blé non artificiellement contaminé en OTA et traité par le procédé Oxygreen®
- groupe 3 : groupe recevant le blé artificiellement contaminé par 2,5 μg d'OTA/kg de blé
- groupe 4 : groupe de rats recevant le blé artificiellement contaminé à 7 μg d'OTA/kg
- groupe 5 : groupe de rats recevant le blé artificiellement contaminé à 40 μg d'OTA/kg
- groupe 6 : groupe de rats recevant le blé artificiellement contaminé à 100 μg d'OTA/kg
- groupe 5Ox® : groupe de rats recevant le blé initialement artificiellement contaminé à 40 μg d'OTA/kg et traité par le procédé Oxygreen®

- groupe 6Ox® : groupe de rats recevant le blé initialement artificiellement contaminé à 100 µg d'OTA/kg et traité par le procédé Oxygreen®

Il est à noter que deux rats femelles du groupe 2, recevant le blé de référence traité par le procédé Oxygreen®, et qu'une femelle du groupe 5, recevant un lot de blé contaminé à 40µg/kg, sont morts au jour 26, après anesthésie. Aucun signe clinique précurseur n'a été observé, avant la mort. Un rat femelle, du groupe 6Ox®, recevant un blé initialement contaminé à 100µg/kg et traité par le procédé Oxygreen®, est mort au jour 3 de l'expérimentation, sans que l'on ne décèle de troubles physiologiques particuliers.

2.2.2 Obtention du matériel biologique

Au cours de l'étude, le blé non consommé, par deux rats mâles et deux rats femelles de chacun des groupes, est récolté à partir de la mangeoire des animaux. Ce blé a été placé dans des sacs individuels identifiés. La contamination en OTA avant, et après traitement par Oxygreen®, a été déterminée sur ces lots.

Les échantillons de sang ont été récupérés à partir du sinus orbital des rats sous anesthésie, à la fin de la période de traitement. Avant récolte du sang, les rats ont été privés de nourriture pendant au minimum 14 heures. Le sang a été centrifugé et la part plasmatique a été conservée et congelée à -20°C. Les urines de 24 heures ont été collectées une fois par semaine au cours de la période de traitement. Les urines ont été congelées à -20°C dans l'attente des analyses.

A la fin de la période de traitement, et au minimum 14 heures après la dernière prise d'aliment, les rats ont été sacrifiés par asphyxie au dioxyde de carbone. Les organes ont été prélevés, pesés et congelés à -80°C.

2.2.3 Etude des paramètres biochimiques et physiologiques

Les paramètres physiologiques et biochimiques ont été déterminés par le CIT (« Safety and Health Laboratory », Evreux, France).

La concentration en érythrocytes, en hémoglobine, en plaquettes, en leucocytes, en lymphocytes, en monocytes, en neutrophiles, et en fibrinogène, a été déterminée avec un analyseur hématologique Bayer Diagnostic H1 par le CIT.

Les paramètres biochimiques du sang, concentration en sodium, en chlore, en calcium, en phosphore inorganique, en glucose, en urée, en créatinine, en cholestérol, en triglycérides, en phosphatase alcaline, en aspartate amino transférase et en alanine amino transférase, ont été déterminés sur un appareil Hitachi 717, par le CIT.

Les paramètres urinaires, présence de glucose, de protéines, de nitrites, de sang et d'urobilignes, ont été déterminés de façon semi-quantitative sur un appareil Clinitek 500, par le CIT.

3. Etude de la génotoxicité

3.1 Produits

3.1.1 Les produits chimiques.

Les produits chimiques utilisés sont dits de qualité "pour analyse". Le phosphate de sodium dihydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), l'Urée, l'hydroxyde de lithium (LiOH), la soude, l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide formique, l'acétate de potassium, le SDS (sodium dodécyl sulfate), l'isopropanol et l'éthanol sont commandés chez VWR International (Fontenay sous bois, France). La bicine, le chlorure de magnésium (MgCl_2), le DTT, la spermidine, le chlorure de sodium (NaCl), l'EDTA, le Tris, le Trizma base, la desferoxamine, le triton X-100, l'iodure de sodium (NaI) et le sucrose proviennent de Sigma (St Quentin Fallavier, France).

Le $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mme, 10 µCi/µl) provient d'Amersham Biosciences (Orsay, France). Le Roti-phénol (saturé en Tris-HCl) provient de Roth-Sochiel (Lauterbourg, France). La poudre de cellulose MN 301 vient de chez Macherey Nagel (Düren, Allemagne). La polyéthylène-imine (HCl à 5%) Corcat PEI P 600xE est fournie par CORCAT (Virginia Chemicals, Portsmouth, VA, USA).

3.1.2 Les enzymes

La phosphodiesterase bovine de rate (SPD) (P 9041), la nucléase de staphylocoque (MN) (N 3755), la protéinase K (P 6556), la ribonucléase T1 (RNase T1) d'*Aspergillus* (R 1003) et la ribonucléase pancréatique de bœuf (RNase A) (R 4875) sont fournies par Sigma chimie (St Quentin Fallavier, France). La nucléase P1 (236 225) (*Penicillium citrinum*) et la T4 polynucléotide kinase (R838 292) proviennent de Roche Diagnostic (Meylan, France).

3.1.3 Matériels de chromatographie

Les plaques de polyéthylène-imine-cellulose (PEI) sont préparées au laboratoire. Les supports en plastique 130cm × 20cm proviennent de chez France Plastics (France). La cellulose de type MN 301 provient de chez Macherey Nagel (Allemagne).

Quatre-vingt grammes de cellulose sont mélangés à 58 ml d'une solution de polyéthylène-imine-HCl à 5 % et 600 ml d'eau distillée. Le mélange, après homogénéisation et dégazage sous vide, est coulé grâce à un étaleur (Desaga Heidelberg, Allemagne) sur les supports plastiques. Les plaques sèchent à température ambiante pendant environ 16 heures. Elles sont ensuite découpées au format 18cm × 26cm, sont lavées au méthanol (1 minute) et rincées dans deux bains d'eau distillée puis séchées à température ambiante. Les plaques sont découpées aux dimensions 18cm × 13cm et sont stockées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Le papier Whatman n°1 Chr provient de Whatman international Ltd (Maidstone, England). Pour les autoradiographies, on utilise des films de radiographie Kodak de 20cm × 40 cm et de 30cm × 40cm, le révélateur Kodak LX24 et le fixateur Kodak AL4 à 20 % (Coradio, France). Les microtubes (1,5 et 2 ml) provenant d'Eppendorf (Hamburg, Allemagne), sont lavés au méthanol puis rincés deux fois à l'eau distillée avant utilisation.

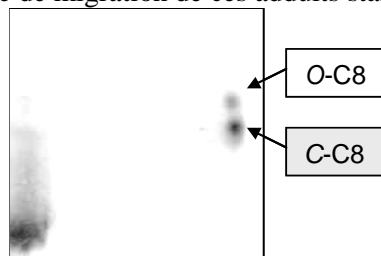
3.1.4 Les adduits standard.

L'adduit B[a]P provient de l'étude interlaboratoire "Interlaboratory standardization and validation of DNA adducts post-labeling methods for human studies" n° 5V0448 (Phillips & Castegnaro, 1999). Il est utilisé comme standard afin de contrôler le bon déroulement du post-marquage. Nous disposons d'une solution d'ADN adduité dont la concentration est de 110 adduits par 10⁸ nucléotides normaux. Nous utilisons à chaque marquage 2µL de cette solution soit 4µg d'ADN.

Un contrôle négatif est réalisé lors de chaque post-marquage, il consiste à analyser un ADN dépourvu d'adduits. Nous utilisons pour cela une solution d'ADN de sperme de saumon préalablement purifié. 2µL de cette solution, correspondant à 7µg d'ADN, sont marqués lors de chaque analyse.

Les adduits standard d'OTA: C-C8 OTA-3'dGMP et O-C8 OTA-3'dGMP ont été synthétisés par l'équipe de R. Manderville. Les standards C-C8 OTA et O-C8 OTA sont marqués radioactivement et sont mis à migrer selon les conditions expérimentales utilisées pour les autres échantillons. La comparaison des coordonnées de migration de ces adduits standard avec celles des adduits détectés sur les plaques de chromatographie, doit permettre d'identifier la présence éventuelle de ces standards dans les échantillons d'ADN de rats marqués.

Le profil chromatographique de migration de ces adduits standards est présenté ci-dessous.



Autoradiogramme #A : migration des adduits OTA standard C-C8 OTA et O-C8 OTA.

3.2 Principe

La détection directe des adduits à l'ADN par la méthode du post-marquage au phosphore 32 est une méthode fine et extrêmement sensible, qui permet de mettre en évidence le caractère génotoxique d'une substance.

Au laboratoire, nous utilisons une version modifiée de la méthode initiale (Randerath *et al*, 1981) qui permet d'atteindre une sensibilité de 1 adduit par 10^{10} nucléotides (Reddy & Randerath 1986). Le principe de cette méthode est présenté sur la figure 8 ci-contre.

Le marquage des adduits à l'ADN se décompose en les étapes suivantes :

- Après extraction et purification de l'ADN, celui-ci est hydrolysé en désoxyribonucléosides 3' - monophosphate par deux enzymes, une endonucléase (nucléase de Staphylocoque) et une exonucléase (Phosphodiesterase de rate). A cette étape le milieu réactionnel contient un mélange de nucléotides normaux et modifiés (les adduits).

- On procède alors à une étape d'enrichissement en adduits qui consiste à déphosphoryler en 3' les nucléotides normaux uniquement, par l'action de la nucléase P1, (Reddy & Randerath, 1986). La configuration structurale de l'adduit protège la liaison du phosphate en 3' et celui-ci sera donc conservé sur les nucléotides adduités après cette étape.

- On réalise alors un marquage enzymatique spécifique des adduits. Seuls les 3'-P-nucléotides sont substrats de la polynucléotide kinase T4, qui a pour propriété de transférer un phosphate radioactif en position γ de l'ATP sur la position 5' du nucléotide. Ainsi, seuls les adduits, ayant conservé leur 3' phosphate, sont marqués.

- Les nucléosides normaux et l'excès de phosphate inorganique sont séparés du, ou des, différents adduits par migration sur plaque de couche mince de polyéthylène-imine cellulose dans des solvants aqueux salins. Ceux-ci permettent la migration des substances hydrophiles, alors que les adduits qui sont hydrophobes restent au point d'origine, ou migrent légèrement en fonction de leur degré d'hydrophobicité.

- Les adduits sont alors séparés par chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'anions, sur plaque de couche mince de polyéthylène-imine cellulose.

- Les adduits et leur emplacement sont visualisés par autoradiographie des plaques. Les autoradiogrammes obtenus deviennent le support du travail de l'analyse qualitative et quantitative. La radioactivité retenue sur les plaques est quantifiée par un appareillage spécial (Bioimager). Les données sont analysées par le logiciel *Ambis* (CSP incorporation, Billerica, USA).

3.3 Obtention de l'ADN et marquage des adduits

3.3.1 Extraction et purification de l'ADN

3.3.1.1 Extraction de l'ADN

Le travail est réalisé dans la glace. La première étape diffère légèrement en fonction de si l'on part d'une culture cellulaire ou d'organes.

3.3.1.1.1 Première étape de l'extraction à partir des cellules

Afin d'obtenir suffisamment d'ADN, il est nécessaire de travailler au départ avec trois flasques de cellules à confluence. Le milieu de culture des cellules est enlevé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS. On ajoute 4ml de SET glacé par flasque de cellules et on gratte à l'aide d'un râteau les cellules présentes sur le fond de la flasque. La suspension cellulaire est prélevée dans un tube de 15ml. On renouvelle le grattage avec 4ml de SET, puis on récupère la suspension qui est ajoutée dans le tube de 15ml. On centrifuge pendant 12 minutes, à 2400rpm, à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 700 μ l de SET. Cette suspension de cellules est transférée dans un tube eppendorf de 2ml. On ajoute 100 μ l de SDS à 20% et on place les cellules 10 minutes à 65°C, puis trente minutes dans la glace.

3.3.1.1.2 Première étape de l'extraction à partir des organes

Environ un demi gramme d'organe est écrasé dans 400µl de SET avec le potter. Le potter est rincé avec du SET. On ajoute 200µL de SDS à 10%. Le mélange est incubé dix minutes à 65°C puis placé dans la glace pendant trente minutes.

Après le passage dans la glace, la suspension de cellules, ou le broyat d'organe sont centrifugés 25 minutes à 13 000rpm à 15°C. On récupère le surnageant (ADN et ARN) dans tube de 15 ml. On ajoute 2 volumes d'éthanol (\approx 4 ml) pur, froid (-20°C) et on secoue vivement : les pelotes d'ADN apparaissent. Les tubes sont placés une nuit au -20°C. Les filaments d'ADN sont récupérés à la pipette ou la totalité du tube de 15ml est centrifugée de 1,5 ml en 1,5 ml dans un tube eppendorf. On centrifuge les pelotes 25 minutes, à 13 000rpm, à 0°C, puis on jette le surnageant délicatement pour ne pas perdre le culot d'ADN. Le tube est séché en tapotant sur un papier. On lave l'ADN avec 1 ml d'éthanol à 90 %, froid et on centrifuge 15 minutes, à 13000rpm, à 0°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est dissous (incuber à 37°C pendant 15 minutes) dans 500µl de SET.

3.3.1.2 Purification et dosage de l'ADN

3.3.1.2.1 Purification de l'ADN

On prépare le mélange de RNase A à 20mg/ml, et de RNase T1 à 10000 UI/ml dans de l'eau ultrapure. Le mélange est mis à bouillir à 100°C pendant 15 minutes et 10µl de ce mélange sont ajoutés à l'échantillon d'ADN à purifier. Au bout d'une heure d'incubation à 37°C, on ajoute à nouveau 10µl du mélange de RNases. On incube une heure supplémentaire à 37°C. On ajoute 25 µl de Protéinase K à 20 mg/ml dans du SET et on incube une heure à 37°C.

On ajoute 500µl (1 Volume) de Rotiphénol (phénol saturé en tris pH 8) et on place sur l'agitateur 20 min. On centrifuge à 13000rpm pendant 15 min à 15°C. Le surnageant est récupéré dans une série des eppendorfs. On renouvelle l'extraction comme précédemment, uniquement lors d'une extraction de l'ADN à partir des organes, et on récupère le surnageant. Cinq cent µl de SEVAG (24 Chloroforme / 1 Alcool isoamylique) sont ajoutés. On vortexe 20 Secondes puis on centrifuge 5 minutes à 15000rpm. Le surnageant, qui doit être limpide, est récupéré.

Deux volumes d'éthanol froid pur (-20°C) et 50µl d'acétate de sodium 3M sont ajoutés. Les pelotes apparaissent immédiatement. Laisser 1 nuit au -20°C. Les pelotes sont récupérées à la pipette, ou la suspension est centrifugée à 13000rpm, à 0°C, pendant 30 minutes. Quatre lavages successifs à l'éthanol à 90% sont réalisés, en centrifugeant à 13000rpm à 0°C pendant 30 minutes. L'ADN, théoriquement pur, est dissout dans 400µl d'eau ultrapure. On laisse à température ambiante toute la nuit, pour qu'il y ait dissolution complète de l'ADN.

3.3.1.2.2 Dosage de l'ADN et contrôle du degré de pureté

Les solutions d'ADN sont mises 15 minutes au bain marie 37°C avant lecture de l'absorbance au spectrophotomètre (Secomam, Anthelie advanced 5). L'intégralité de l'échantillon est transférée dans des cuves en quartz de 1 ml de contenance. La pureté et la quantité d'ADN en solution sont déterminées en faisant un spectre d'absorbance entre 220 et 320nm. Le maximum d'absorption de la molécule d'ADN se situe entre 258 et 260nm. Au delà de cet intervalle, un déplacement du maxima d'absorption vers 250nm ou 280nm indique une contamination de l'ADN par de l'ARN (et /ou des traces de phénol), ou par des protéines respectivement. Si le degré de pureté de l'ADN n'est pas satisfaisant, la purification doit être répétée.

On calcule la concentration en ADN de l'échantillon en considérant que 1 unité d'absorbance équivaut à 50µg/ml. Le volume correspondant à 7µg d'ADN est prélevé dans la solution mère d'ADN et est séché à l'aide d'une centrifugeuse à évaporation sous vide (« Speedvac concentrator » de Savant). A partir de cette étape, l'aliquote d'ADN est prêt à être marqué.

3.3.2 Marquage des adduits

3.3.2.1 Hydrolyse de l'ADN

Sept µg d'ADN sont séchés puis hydrolysés en nucléosides-3'-monophosphates par les actions combinées de la phosphodiesterase de rate, et, de la nucléase de staphylocoque pendant 4 heures à 37 °C dans 10µl du mélange réactionnel suivant :

- 0,47µl de phosphodiesterase de rate (2mg/ml)
- 1µl de nucléase de Staphylocoque (3,2mU/µg d'ADN)
- 2µl de tampon succinate (200 mM)/CaCl₂ (100mM), pH 6 (avec HCl pur)
- 6,53µl d'eau ultra pure

3.3.2.2 Enrichissement à la nucléase P1

L'ADN hydrolysé est incubé 45 min à 37 °C après avoir rajouté 5µl du milieu réactionnel suivant :

- 1,5µl de nucléase P1 (4mg/ml)
 - 1,6µl de ZnCl₂ (1mM)
 - 1,6µl Acétate de Na (0,5M, pH 5)
 - 0,3µl d'eau ultra pure
- La réaction est stoppée par l'ajout de 3µl de Tris base à 500mM.

3.3.2.3 Marquage des adduits au ³²P en position 5'

Après enrichissement à la nucléase P1, les échantillons sont incubés 45 minutes en salle de manipulation de la radioactivité, à 37 °C, en présence de 5µl de mélange réactionnel suivant :

- 2µl de tampon bicine *
- 0,32µl de polynucléotides kinase T4 (10UI/µl)
- 100µCi d' ³²P-ATP préalablement séché
- 2,68µl d'eau ultra pure

* le tampon bicine est constitué de la façon suivante : 500µl de bicine à 800µM, 500µl de dithiothréitol (DTT) à 400mM, 500µl de MgCl₂ à 400mM, 55µl de spermidine à 400mM, 445µl d'eau distillée. Le pH est ajusté à 9,8 avec de la soude.

3.3.2.4 Etapes de contrôle

3.3.2.4.1 Test d'efficacité de l'hydrolyse : marquage des nucléotides normaux

2µl de la solution d'ADN hydrolysée sont prélevés et dilués (x 1200) dans de l'eau ultra-pure. Un volume de 5µl de cette solution est prélevé et incubé en salle chaude 1h à 37°C en présence de 8µl d'eau ultra pure et de 5µl du mélange réactionnel suivant :

- 2µl de tampon bicine *
- 0,32µl de polynucléotides kinase T4 (10UI/µl)
- 100µCi de ³²P-ATP préalablement séché
- 2,68µl d'eau ultra pure

Après une heure d'incubation, le volume réactionnel est complété jusqu'à 300µl par de l'eau ultra pure soit 282µl, puis 3µl sont prélevés et déposés sur une plaque de PEI-cellulose de 18cm de long. Celle-ci est placée dans du tampon de migration à 250 mM de (NH₄)₂SO₄ et 40 mM de NaH₂PO₄, pendant 1h30. La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée. Les nucléotides normaux sont séparés comme présenté ci-dessous.

Cette étape de contrôle permet de vérifier l'absence d'ARN et de protéines, mais aussi de quantifier les nucléotides normaux et de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse. Un smear au niveau de l'origine du dépôt est le signe d'une contamination en protéines. Un dédoublement des quatre spots de nucléotides indique la présence d'ARN. L'intensité, plus prononcée, des tâches correspondant aux nucléotides A et C que celle des tâches correspondant aux nucléotides T et G témoigne d'une hydrolyse incomplète, d'un faible marquage ou d'un déficit d'ATP. Il est indispensable qu'il y ait un excès d'ATP.

3.3.2.4.2 Test d'efficacité de l'enrichissement par la nucléase P1

Un volume de 50µl d'eau ultra-pure est ajouté dans le tube vide, ayant contenu au préalable le mélange d'adduits à l'ADN marqués au ^{32}P . On réalise ainsi une dilution du mélange d'adduits qui est resté présent sur les parois du tube.

Un volume de 5µl est alors prélevé et déposé sur une plaque de PEI-cellulose de 18cm de long. Celle-ci est placée 1h30 dans du tampon de migration à 250mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 40mM de NaH_2PO_4 . La plaque est ensuite séchée, exposée 40 min à température ambiante puis autoradiographiée.

Ce test permet de savoir si l'hydrolysate d'ADN a bien été enrichi en adduits par le traitement avec la nucléase P1 qui catalyse la déphosphorylation en 3' des nucléotides normaux. Ceux-ci ne sont plus des substrats de la polynucléotide kinase et ne doivent donc pas être marqués au ^{32}P pendant le marquage des adduits à l'ADN. Sur le film d'autoradiographie, les bases de l'ADN ne doivent être que d'une très faible intensité.

3.3.2.4.3 Efficacité du marquage des adduits par la T4 polynucléotide kinase.

L'efficacité de la T4 polynucléotide kinase est contrôlée par le marquage d'une solution standard d'adduits de B[a]P, de concentration connue, provenant du projet européen EU5V0448 organisé par le Dr Castegnaro et ayant eu pour but de standardiser les protocoles de détection des adduits à l'ADN (Phillips & Castegnaro, 1999).

Le marquage d'un ADN de sperme de saumon pur et dépourvu d'adduits est un contrôle négatif qui permet de vérifier l'absence de contaminants dans le lot d'ATP.

3.3.3 Séparation et identification des adduits

3.3.3.1 Séparation par chromatographie multidimensionnelle sans « contact-transfert »

Pour la séparation par chromatographie multidimensionnelle sans « contact-transfert », une plaque de chromatographie unique pour chaque échantillon est utilisée pour la séparation des adduits. La plaque de cellulose utilisée mesure 18cm par 15cm. Les échantillons sont déposés dans le coin supérieur gauche de la plaque de cellulose. Un papier Whatman de 20cm est agrafé en haut de plaque. Les plaques sont placées dans le solvant de migration D1 composé de phosphate monosodique, à une molarité inférieure à celle utilisée lors de la séparation par chromatographie multidimensionnelle avec « contact-transfert ». (2,3M ; pH 5,7). La migration dure 16 heures. Au terme de la migration, le papier Whatman, ainsi que les deux centimètres supérieurs de la plaque de cellulose sont découpés. La migration D2 est réalisée perpendiculairement à la migration D1, après rotation de la plaque d'un quart de tour vers la gauche. Les migrations D3 et D4 sont réalisées perpendiculairement à la migration D2, après rotation de la plaque d'un quart de tour vers la gauche comme présenté sur la figure 7 ci-dessous.

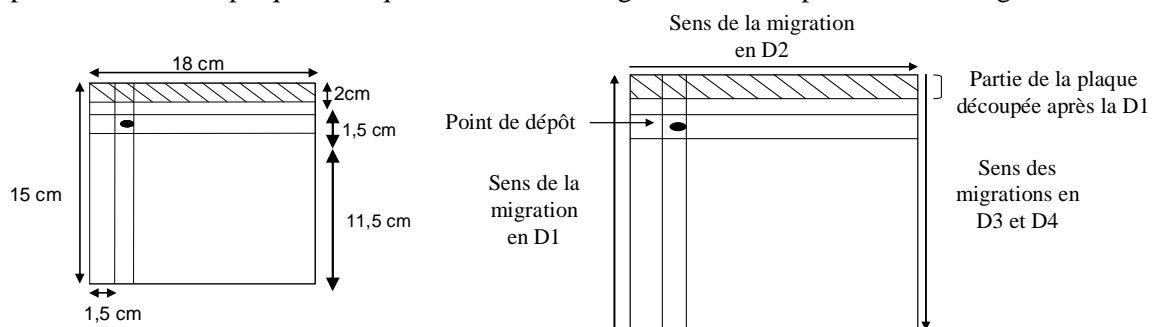


Figure 7. : disposition des points de dépôt des échantillons d'ADN contenant les adduits marqués radioactivement et représentation du sens de migration des adduits en D2, D3 et D4.

Les solvants de migration utilisés pour les migrations D2, D3, et D4 sont identiques à ceux décrits pour la séparation multidimensionnelle avec « contact-transfert ». De même, la taille des plaques, du papier Whatman, ainsi que la durée de migration sont identiques à celles décrites ci-après.

3.3.3.2 Séparation par chromatographie multidimensionnelle avec « contact-transfert »

3.3.3.2.1 Dépôt des échantillons et purification des adduits (D1)

A l'extrémité de chacune des plaques de cellulose de 18cm × 13cm, est accroché un papier Whatman de 20cm de long, comme présenté sur la figure ci-dessous.

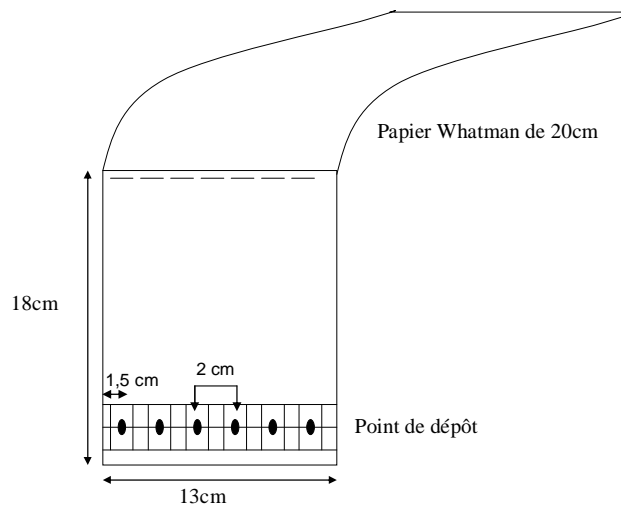


Figure 8. : disposition des points de dépôt des échantillons d'ADN contenant les adduits marqués radioactivement.

Chaque plaque est prévue pour recevoir six dépôts d'échantillons. Les dépôts sont espacés de 2cm. La migration dure 16 heures dans le tampon de migration composé de phosphate monosodique (3M ; pH 5,7). Ce solvant permet de ne pas entraîner les adduits hydrophobes qui restent au point de dépôt, alors que les impuretés et l'ATP en excès sont entraînés par le solvant. Une fois la migration terminée, la bande de papier est jetée et la plaque est lavée deux fois 5 min dans de l'eau distillée sous agitation.

Une autoradiographie des plaques permet de vérifier la pureté de l'échantillon, ainsi que de s'assurer que les adduits sont restés au niveau du point de dépôt. Le film photo est mis en contact 20 minutes avec les plaques en salle obscure. Les passages successifs dans le révélateur, le fixateur ainsi que dans 3 bains de rinçages, permettent l'obtention des films autoradiographiques.

3.3.3.2 Transfert des adduits par contact et migration D2

Les points de dépôt sont découpés sur la plaque de D1 et sont transférés sur une seconde plaque de cellulose. Le carré de cellulose correspondant au point de dépôt de la plaque de D1, est maintenu par des aimants sur la nouvelle plaque de cellulose. Le point de dépôt est orienté de façon à ce que les deux faces de celluloses soient en contact.

Le contact transfert et le sens de migration en D2 sont schématisés ci-après.

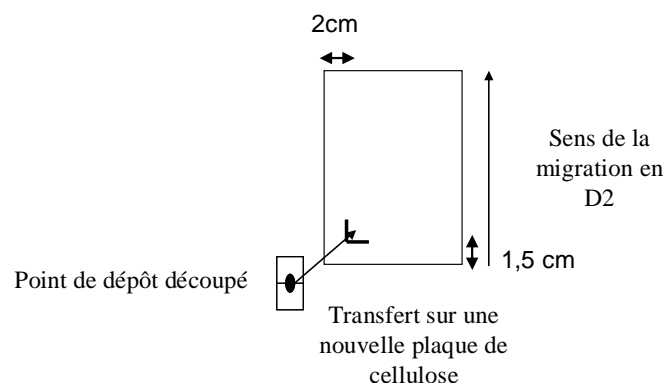


Figure 9. : représentation du transfert des adduits présents sur le point de dépôt découpé sur une nouvelle plaque de chromatographie pour la séparation des adduits au cours de la migration D2.

La migration est amorcée dans de l'eau distillée et les plaques sont ensuite placées dans des cuves contenant 70ml de solvant de migration D2 (Urée 8,5M, formate de Li 5,3M, pH = 3,5). La migration dure environ 4 heures à 25 °C. Les plaques sont ensuite lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes puis séchées. Les plaques sont découpées à la dimension 16 × 13cm.

3.3.3.2.3 Migration D3

La migration D3 est réalisée perpendiculairement à la migration D2 (1/4 de tour à gauche) et permet de faire migrer les adduits dans une seconde dimension. Une bande de papier Whatman (16cm × 2,5cm) est agrafée en haut de la plaque. La préparation de la plaque pour la D2, ainsi que le sens de migration des adduits sont schématisés ci-dessous.

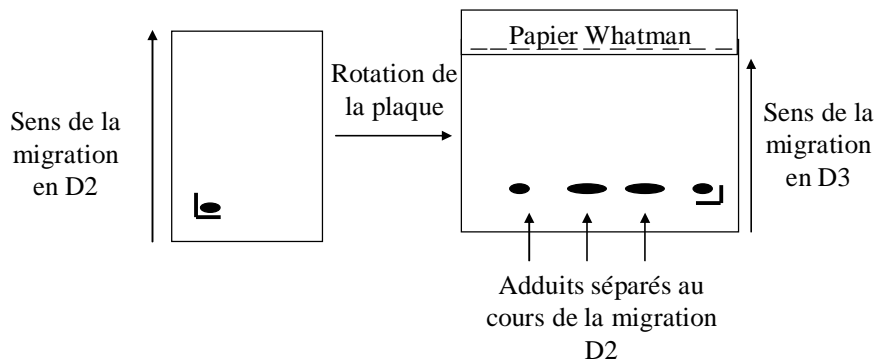


Figure 10. : Rotation de la plaque de chromatographie après la séparation des adduits en D2 et séparation des adduits selon la seconde dimension en D3.

La migration est amorcée dans un solvant D3' (NaH_2PO_4 0,7M). Les plaques sont placées dans des cuves contenant 70 ml de solvant de migration (NaH_2PO_4 0,6M, Urée 7M, pH 6,4), à 25°C. La migration dure 3 h. Après avoir éliminé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois à l'eau distillée pendant 5 minutes puis séchées.

3.3.3.2.4 Migration D4

La migration D4 est réalisée dans le même sens que la migration précédente, comme présenté sur la figure 11 ci-dessous.

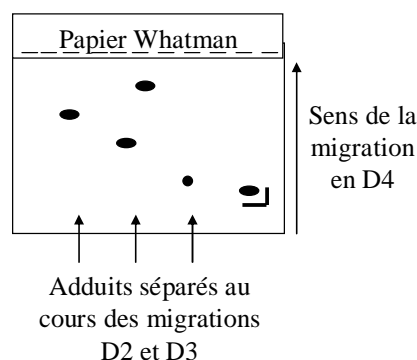


Figure 11. : Séparation des adduits après les migrations D2 et D3, et sens de migration en D4 des adduits.

Il s'agit essentiellement d'un lavage permettant d'éliminer la radioactivité non spécifique et donc de réduire le bruit de fond. Une bande de papier Whatman (16cm × 4cm) est agrafée en haut de la plaque. La migration dure une nuit dans 70 ml de phosphate monosodique (NaH_2PO_4 1,7M, pH= 6) à 25°C. Après avoir enlevé le papier Whatman, les plaques sont lavées deux fois 5 minutes à l'eau distillée puis séchées et découpées au format 9,5cm × 14,5cm à partir de l'origine du dépôt.

3.3.4 Autoradiographie et quantification des adduits.

Les plaques sont mises à autoradiographier avec des films ultrasensibles (20cm/40cm) sur lesquels on place un écran amplificateur. L'ensemble des plaques, films et amplificateurs est mis 72h à -80°C. Les films sont ensuite placés dans un bain de révélateur (20 %) jusqu'à apparition des spots d'adduits (1 minute environ), puis rincés à l'eau distillée et fixés pendant 1 minute dans un bain de fixateur (20 %). Les films sont finalement rincés dans trois bains successifs d'eau distillée. Après séchage, les films sont ensuite scannés sur l'ordinateur.

Pour la quantification des adduits, les plaques de cellulose sont scannées par un bio-imager et les scans sont traités par le logiciel « Ambis ». Les valeurs obtenues par quantification au bioimager sont exprimées en coups par minute (CPM). Le taux d'adduits est exprimé en adduits/ 10^9 nucléotides en tenant compte de la quantité d'ADN, de l'activité spécifique de l'ATP, ainsi que du facteur de décroissance de l'ATP.

4. Techniques analytiques

4.1 Produits et matériel

4.1.1 Réactifs et petit équipement

Le chlorure de potassium (KCl), le chlorure de magnésium ($MgCl_2$), l'acétate de sodium trihydraté ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), l'hydroxyde de sodium (NaOH) et l'acide sulfurique à 95% (H_2SO_4) de qualité « pour analyse » sont fournis par VWR international, France. Le formate d'ammonium (CH_5NO_2) provient de chez Acros Organics (Belgique). L'acide formique (CH_2O_2) est de qualité ultrapure compatible avec la spectrométrie de masse ; il provient de VWR (France).

L'acétonitrile (C_2H_5N), le chloroforme ($CHCl_3$), l'acide chlorhydrique (HCl) à 37%, le méthanol (CH_4O), le propanol-2 (C_3H_7OH), l'acide orthophosphorique à 85% (H_3PO_4) et l'acide acétique glacial (CH_3COOH) sont des solvants de qualité ultrapure, compatibles avec une analyse HPLC : ils sont fournis par ICS (France) sous la marque Scharlau Chemie S.A. (Barcelone, Espagne). L'ensemble des solutions est préparé avec de l'eau ultra-purifiée et déminéralisée.

Les membranes en nylon de 0,45µm utilisées pour le dégazage des phases mobiles, les flacons en verre d'une contenance de 1,5 ml, les flacons en plastique de 250µL ainsi que l'ensemble des consommables HPLC (joints, capuchons, raccords...) sont fournis par ICS, France.

Les filtres 0,2µm SPARTAN RC 13mm utilisés pour la filtration des échantillons avant leur passage en HPLC, sont fournis par Schleicher & Schüell, France.

La verrerie de laboratoire (erlenmeyer, éprouvettes graduées, fioles jaugées, pipettes), est distribuée par VWR international.

L'ochratoxine A et l'ochratoxine B sont fournies par Sigma-Aldrich, France. L'OTHQ et l'OTQ-GSH sont fournies par le Pr. Manderville, les formes hydroxylées 10-OHOA, 4R- et 4S-OHOA ont été fournies par le Dr Størmer.

La carboxypeptidase A, d'origine pancréatique bovine à 1000 unités/ml, et le trizma base sont fournis par Sigma-Aldrich, France .

Les tubes en polypropylène de capacité 15 et 25 ml sont fabriqués par Falcon et distribués par Becton-Dickinson, France.

L'ensemble du matériel de laboratoire est décontaminé par une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 4%.

4.1.2 Appareillage

L'eau milliQ ultrapure est obtenue après passage d'eau distillée sur une cartouche de charbon actif, deux colonnes échangeuses d'ions et une machine Barnstead fournies par Fisher Bioblock, France.

Un spectrophotomètre UV (Anthelie 5 advanced) de la marque SECOMAM sert à quantifier les solutions standard de mycotoxines.

L'agitateur orbital Heidolph unimax 2010 est fourni par VWR international, France. Le bain à ultra-sons est de la marque NEY. L'évaporateur rotatif avec un bain thermostaté est de la marque Buchi.

La centrifugeuse à évaporation sous vide "Speedvac concentrator", adaptée pour la réception des tubes eppendorf, provient de chez Savant.

La centrifugeuse réfrigérée Sigma 4 K 15 et adaptée pour la réception de tubes de type Falcon de capacité 50 et 15 mL provient de chez Fisher Bioblock Scientific, France.

Les pompes alimentant le système en phase mobile sont distribués par ICS, France.

Les phases stationnaires utilisées sont des colonnes chromatographiques ProntoSil (25*0,40 cm) 120-3-C₁₈. En amont de la colonne chromatographique est placée une précolonne (ULTRASEP) de silice portant des greffages C₁₈, de longueur 1 cm et de granulométrie 10µm. La colonne et la pré-colonne sont fabriquées par Bischoff, et fournies par ICS, France.

La détection est assurée par un fluorimètre Hitachi, FI detector L-7485 Lachrom distribuée par Merck. La chaîne possède un injecteur manuel de la marque ICS.

Le système d'acquisition des données est le logiciel NORMASOFT commercialisé par ICS, France.

4.2 Extraction des mycotoxines

4.2.1 Principe général

Les mycotoxines sont extraites en conditions acides à partir d'un échantillon de blé ou d'organe broyé, ou à partir du sérum et des urines. L'acidification et la force ionique de la solution d'extraction, permettent de rompre en partie les liaisons des toxines aux constituants de la matrice et favorisent ainsi leur extraction. La purification de l'extrait est réalisée par partage de phase : en fonction de leur état d'ionisation, les mycotoxines seront solubles, tantôt dans la phase aqueuse, tantôt dans la phase organique.

4.2.2 Extraction à partir du blé

Cinquante grammes de blé finement broyés sont extraits avec 400 ml de solvant d'extraction acétonitrile/eau (9 :1), l'eau contenant 4% de chlorure de potassium et 0,8 ml d'acide sulfurique concentré.

Le solvant d'extraction et le blé, disposés dans un erlenmeyer de 500 ml, sont placés à agiter sur un agitateur rotatif pendant 20 minutes. L'extrait est filtré sous vide sur papier filtre Wattman n°4. Après filtration, un aliquot de 200 ml de ce filtrat est dégraissé à deux reprises, par addition de 100 ml de n-hexane. Après agitation une minute, le filtrat dégraissé est placé dans une ampoule à décanter. Après une minute de décantation, la phase inférieure est récupérée dans un erlenmeyer de 250 ml. Après addition de 50 ml d'eau ultrapure, la phase inférieure acétonitrile/eau est extraite par 100 ml de chloroforme. Le mélange acétonitrile/eau et chloroforme est placé 10 minutes sur l'agitateur rotatif ; après une décantation de 10 minutes, la phase chloroformique inférieure est récupérée dans un erlenmeyer propre. La phase acétonitrile/eau supérieure est à nouveau extraite à deux reprises par addition de 20 ml de chloroforme. Après agitation 10 minutes et décantation 10 minutes, la phase chloroformique est récupérée.

Au terme de ces trois extractions, les extraits chloroformiques réunis dans un même erlenmeyer, sont extraits à trois reprises par 50 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 5%. Après agitation (10 minutes) et décantation (10 minutes), la phase supérieure bicarbonate est placée dans un erlenmeyer propre et la phase chloroformique inférieure est conservée pour la réalisation des deux dernières extractions par le bicarbonate (réalisées avec les mêmes volumes de bicarbonate).

Au terme des trois extractions au bicarbonate, l'ensemble des extraits bicarbonates, réunis dans un même erlenmeyer, sont acidifiés jusqu'à pH 1,5 par ajout d'acide chlorhydrique concentré.

Cet extrait bicarbonate acidifié est extrait à trois reprises par du chloroforme (volumes de 100, 50 et 50 ml) ; après agitation (10, 5 et 5 minutes) et décantation (10 minutes à chaque étape d'extraction), l'extrait chloroformique inférieur est récupéré dans un erlenmeyer propre et sec.

L'ensemble des extraits chloroformiques réunis sont évaporés (sous vide d'air) dans des ballons à fond conique de 50 ml baignant dans un bain marie à 45 °C. Quand le volume de chloroforme est réduit à environ 5 ml, le chloroforme est transféré dans un tube à hémolyse pour être évaporé sous flux d'azote millilitre par millilitre. Le ballon est rincé au chloroforme ; le chloroforme de rinçage est également séché sous azote avec le reste du chloroforme. L'extrait sec est remis en suspension dans 1 ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une minute. Quand la remise en suspension

est totale, ce ml de méthanol est filtré sur un filtre de 0,2µm préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500µl de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait remis en suspension dans 500µl de méthanol est placé dans un flacon en verre parafilmé, conservé à -20°C en attendant d'être analysé par HPLC .

4.2.3 Extraction à partir du sang, sérum et urines

L'urine, et le sérum conservés à -20° sont décongelés puis homogénéisés.

Pour réaliser l'extraction sur 2ml de fluide, on ajoute 4ml de $MgCl_2$ à 0.2M et 4ml d'HCl à 0.1M. Si besoin est, on ramène le pH à 2,5 par addition de quelques gouttes d'HCl concentré. On ajoute 8ml de chloroforme, puis on agite pendant 10 minutes avant de centrifuger 10 minutes, à 4°C, à 2000g. La phase chloroformique inférieure est récupérée et on renouvelle une extraction du surnageant par 8ml de $CHCl_3$. Les deux phases chloroformiques sont réunies. On réalise une extraction par 16 ml $NaHCO_3$ à 0,1M. On agite au vortex pendant 1 minute puis on centrifuge 5 minutes à 4°C, à 2000 g. On récupère la phase supérieure de bicarbonate, et on renouvelle l'extraction de la phase chloroformique inférieure par 16ml de bicarbonate. Les phases bicarbonates réunies sont acidifiées à pH 2,5 avec de l'HCl pur. On réalise une extraction par 16 ml de $CHCl_3$, on agite 10 minutes puis on centrifuge 10 minutes à 2500g, à 4°C. On récupère la phase chloroformique et on répète l'extraction de la phase bicarbonate acidifiée par le chloroforme. Après agitation et centrifugation, les phases chloroformiques sont récupérées et évaporées dans un ballon à l'évaporateur rotatif petit à petit. Quand le volume de chloroforme est réduit à environ 5 ml, le chloroforme est transféré dans un tube à hémolyse pour être évaporé sous flux d'azote millilitre par millilitre. Le ballon est rincé au chloroforme ; le chloroforme de rinçage est également séché sous azote avec le reste du chloroforme. L'extrait sec est remis en suspension dans 1 ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une minute. Quand la remise en suspension est totale, ce ml de méthanol est filtré sur un filtre de 0,2µm préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500µl de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait remis en suspension dans 500µl de méthanol est placé dans un flacon en verre parafilmé, conservé à -20°C en attendant d'être analysé par HPLC.

4.2.4 Extraction à partir des organes

L'organe est broyé en présence du solvant d'extraction en conditions acides, puis la toxine est purifiée par partage en phase liquide.

Un demi gramme d'organe est broyé au potter dans 3 ml de solvant d'extraction $MgCl_2$ 0.1M /HCl 0.05M (v/v). Le potter est rincé avec 4 ml de ce mélange $MgCl_2$ /HCl à deux reprises. On ajoute enfin 10 ml de $MgCl_2$ 0.2M /HCl 0.1M (v/v) et on ramène le pH à 2,5 par addition de quelques gouttes d'HCl concentré. On ajoute 20ml de chloroforme et on met à agiter pendant 10 min. Après une centrifugation 10 minutes, à 4°C, à 5000 rpm, la phase chloroformique inférieure est récupérée dans un tube 50 ml. On refait une extraction du surnageant avec 20ml de $CHCl_3$. Après agitation et centrifugation, les phases chloroformiques sont récupérées et rassemblées. On ajoute 40 ml de bicarbonate à 0,1M, on agite au vortex une minute puis on centrifuge 5 minutes à 4°C à 5000 rpm. On récupère la phase bicarbonate supérieure et on renouvelle l'extraction au bicarbonate par addition de 40 ml. Les phases bicarbonates sont réunies puis sont acidifiées jusqu'à pH 2 avec de l'HCl concentré. On ajoute 80 ml de chloroforme et on place à agiter 10 minutes. La phase chloroformique est récupérée après centrifugation 10 minutes, à 4°C, 5000 rpm. On refait une extraction de la phase bicarbonate par 80ml de chloroforme. Après agitation et centrifugation, les phases chloroformiques sont récupérées et évaporées dans un ballon à l'évaporateur rotatif petit à petit. Quand le volume de chloroforme est réduit à environ 5 ml, le chloroforme est transféré dans un tube à hémolyse pour être évaporé sous flux d'azote millilitre par millilitre. Le ballon est rincé au chloroforme ; le chloroforme de rinçage est également séché sous azote avec le reste du chloroforme. L'extrait sec est remis en suspension dans 1 ml de méthanol et placé dans un bain à ultrasons pendant une minute. Quand la remise en suspension est totale, ce ml de méthanol est filtré sur un filtre de 0,2µm préalablement conditionné avec du méthanol. Le filtre est rincé avec 500µl de méthanol. Le méthanol filtré est placé dans un tube à hémolyse et le filtrat est séché au bain marie, sous flux d'azote. Une fois sec, l'extrait

remis en suspension dans 500µl de méthanol est placé dans un flacon en verre parafilmé, conservé à -20°C en attendant d'être analysé par HPLC.

4.3 Préparation de solutions standard de toxines

4.3.1 OTA, OTB, OTHQ

Les mycotoxines reçues en poudre (OTA, OTB, OTHQ) sont mises en suspension dans du méthanol ultra pur. Un milligramme de toxine est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans un millilitre de solvant.

Pour l'OTA et l'OTB, cette solution mère est diluée cent fois et la concentration de la solution diluée est déterminée avec précision par dosage de l'absorbance au spectrophotomètre selon les paramètres suivants :

Pour l'OTA (PM = 403.8 g/mole)

Absorbance : 330 nm. A cette longueur d'onde, le coefficient d'absorption molaire de l'ochratoxine A dans le méthanol est de $5500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Pour l'OTB (PM = 250.3 g/mole)

Absorbance : 321 nm. A cette longueur d'onde, le coefficient d'absorption molaire dans le méthanol est de $5490 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Pour l'OTHQ (PM= 385 g/mole)

On distingue l'OTHQ sous deux formes: sa forme OTHQ1 et sa forme dianionique OTHQ2 (OTHQ²⁻).

Absorbance OTHQ1: 350 nm. A cette longueur d'onde, le coefficient d'absorption molaire dans le méthanol est de $5952 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Absorbance OTHQ2: 396 nm. A cette longueur d'onde, le coefficient d'absorption molaire dans le méthanol est de $11\,808 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La loi de Beer-Lambert permet de déterminer la concentration en toxine de la solution après lecture de l'absorbance selon la formule :

$$DO = \epsilon l C$$

où l est la largeur de la cuve en cm

C la concentration en toxine en mole/L

ϵ le coefficient d'absorption molaire de la toxine en $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

4.3.2 Préparation de dérivés standard de l'OTA

4.3.2.1 Préparation de l'OP-OA , forme ouverte de l'OTA

La forme ouverte de l'ochratoxine A, l'OP-OA, a été préparée *in vitro* au laboratoire d'après le protocole de Xiao *et al* (1996). La procédure est basée sur le fait que le cycle lactone est hydrolysé en présence d'une base forte.

Un milligramme d'OTA est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans 300µl de DMSO auxquels sont ajoutés 300µl de NaOH (1N). Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante durant 24h, puis il est conservé à 4°C. Les solutions de standard seront diluées au moment de leur analyse en HPLC.

4.3.2.2 Préparation des formes OT α et OT β

L'OTA et l'OTB sont hydrolysées respectivement en OT α et OT β sous l'action de la carboxypeptidase A. Un milligramme de chaque ochratoxine est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans 975µl de tampon (TrisHCl 0.04 M - NaCl 1 M, pH 6,4). 25µl de carboxypeptidase A sont ajoutés aux solutions de toxine et incubés 24 heures à température ambiante.

Afin d'extraire les formes OT α et OT β , le mélange réactionnel est acidifié à pH 2,5 par addition d'environ 20µl d'HCl à 1M; 1ml de chloroforme est ajouté. Le mélange est agité pendant trois minutes puis centrifugé 20 min à 1500g à 15°C. La phase chloroformique inférieure est prélevée puis séchée par évaporation sous vide. L'extrait sec est dissout dans 500µl de méthanol et les solutions d'OT α et d'OT β sont conservées à -20°C.

4.3.3.3 Préparation de la forme méthylée de l'OTA

Les formes méthylées et hydroxylées de l'OTA, ont été préparées en présence de méthanol et d'un acide fort (HCl).

Un milligramme d'OTA est pesé sur la balance de précision et remis en suspension dans 900µl de méthanol auxquels sont ajoutés 100µl d'HCl (6N). Pour les standards déjà en solution dans du méthanol, il suffit d'ajouter un volume d'HCl (6N) pour 9 volumes de méthanol. Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante durant 24h, puis il est conservé à 4°C. Les solutions de standard seront diluées au moment de leur analyse en HPLC.

4.4 Analyse par HPLC

4.4.1 Principe

La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance ou HPLC est une technique analytique qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés, contenus dans un mélange, en vue de leur caractérisation et de leur quantification : le système permettant d'effectuer cette séparation est appelé système de phases et est composé de la phase stationnaire et de la phase mobile. La méthode de chromatographie HPLC utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie d'adsorption en phase inverse. La phase stationnaire utilisée est constituée de groupements C₁₈ greffés sur un support de silice.

4.4.2 Description du système

La chaîne HPLC est constituée de divers éléments schématisés ci-après.

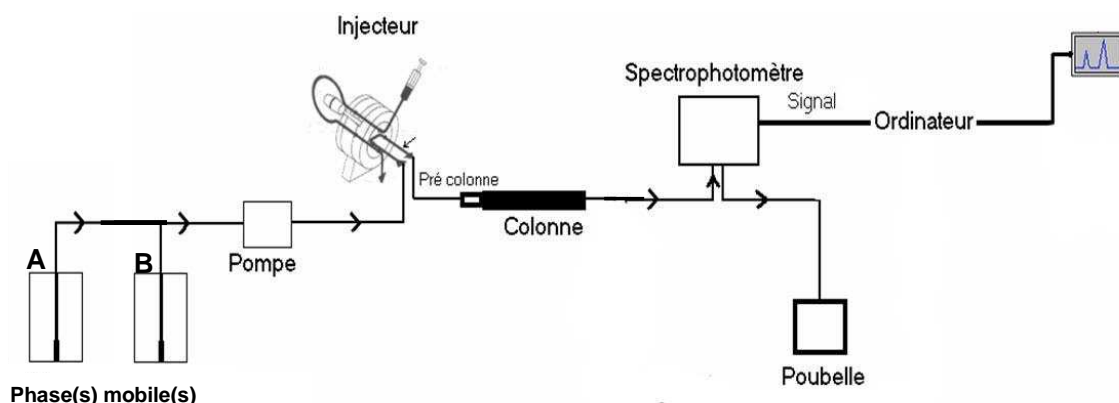


Figure 12. : représentation des différents éléments composant la chaîne HPLC.

La phase mobile alimente le chromatographe en permanence : elle est délivrée dans le système par une pompe dont le débit est modulable. Les composés à séparer, en suspension dans un solvant, sont prélevés grâce à une seringue puis chargés dans le chromatographe par l'injecteur au niveau de la boucle d'injection. Les molécules sont entraînées par la phase mobile vers la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire. L'affinité des composés pour la phase stationnaire déterminera leur rétention. Un détecteur fluorimétrique suit en permanence l'élution du composé et le signal obtenu est enregistré au niveau de l'ordinateur. Une bonne séparation des composés d'intérêt, grâce à l'utilisation de phases mobiles et stationnaires adaptées à ceux-ci, permettra d'observer au niveau de l'intégrateur un pic isolé, fin et symétrique dont la surface est fonction de la concentration de la solution analysée en ce composé .

L'enregistrement et l'analyse des chromatogrammes sont effectués par un logiciel adapté (Normasoft). La concentration en mycotoxines est calculée à l'aide d'une courbe étalon préalablement établie avec des solutions de mycotoxines de concentrations connues.

4.4.3 Paramètres d'analyse

La phase mobile est délivrée par la pompe à un débit défini en fonction de la phase utilisée, afin d'obtenir une pression, variable lors de l'utilisation de la chaîne HPLC en mode gradient, de 20mPa à maximum 30mPa dans la colonne chromatographique. Le volume d'échantillon prélevé et injecté manuellement (vanne d'injection rhéodyne de chez ICS) dans le système est de 20µl. L'analyse peut être réalisée en conditions isocratiques, ou en condition de gradient de phase.

4.4.3.1 Analyses HPLC réalisées en conditions isocratiques

La composition de la phase mobile reste identique sur toute la durée de l'analyse. Nous avons utilisé la phase suivante, appelée phase « Molinié » :

600 mL acide Ortho-phosphorique (H_3PO_4) à 0,33M,
400 mL Acétonitrile,
50 mL Propanol-2

Cette phase permet la séparation et la quantification de l'OTA, de ses métabolites ainsi que de la CIT.

Sur cette phase, l'analyse dure 35 minutes. L'OP-OTA est éluée après 8 minutes, la CIT après 10 minutes, l'OTB après 12,5 minutes, et l'OTA après 25 minutes.

Pour l'OTA et ses dérivés, la détection au spectrofluorimètre est réalisée avec une longueur d'onde d'excitation de 330nm, et une longueur d'onde d'émission de 465nm.

Pour la détection de la CIT, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement 331nm et 500nm.

4.4.3.2 Analyses HPLC réalisées en conditions de gradients

La composition de la phase mobile varie, au cours de l'analyse, d'un solvant A à un solvant B dans des proportions déterminées au préalable.

Le gradient « Faucet » a été utilisé pour l'analyse de l'OTA et de ses métabolites. Les phases A et B sont composées comme décrit ci-dessous.

Solvant A: 200 mL Méthanol, 200 mL Acétonitrile, 600 mL eau, formate d'ammonium 0,34g (6,5mM), acide formique jusqu'à pH 3,5

Solvant B: 350 mL Méthanol, 350 mL Acétonitrile, 600 mL eau, formate d'ammonium 0,34g (6,5mM), acide formique jusqu'à pH 3,5

Le gradient est le suivant : à 0 minute 100% A, à 10minutes 100% A, à 25 minutes 30% A, à 45 minutes 0% A, à 55 minutes 0% A, et à 58 minutes 100% A .

L'évolution de la concentration de ce gradient, en chacune de ces deux phases, au cours de l'analyse est présentée ci-après.

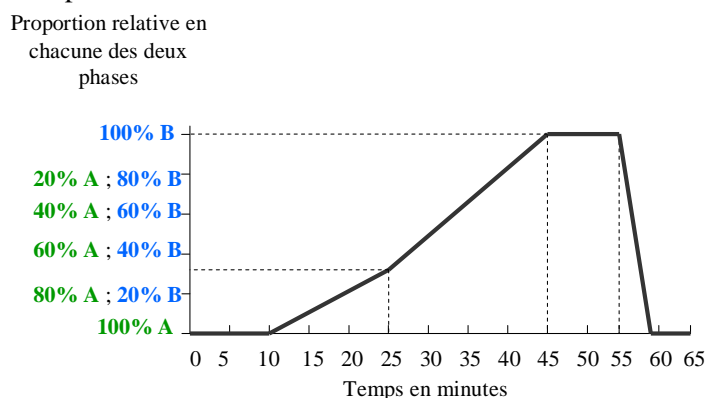


Figure 13. : composition du gradient en chacune des deux phases A et B au cours du temps de l'analyse HPLC.

L'analyse HPLC avec ce gradient dure 65 minutes. Les temps de rétention de l'OTA et de ses métabolites sont décrits dans le tableau 8 ci-dessous.

Métabolite	Temps de rétention en minutes
OT β	8,5
Ota	18,5
Dérivé décarboxylé de l'OTHQ	23,6
OP-OA	28
10 R OH-OTA	30
4-S-OH-OTA	30,2
4 R-OH OTA	32,5
OTHQ (forme quinone de l'OTA)	34
OTB	34
OTA	42
Méthyl OTA	53

tableau 8. : Temps de rétention en minutes de l'OTA et de ses métabolites sur le gradient « Faucet ».

4.4.4 Protocole pour l'analyse d'échantillons par HPLC

Lors de la première utilisation, la colonne chromatographique est conditionnée toute une nuit par le passage d'un mélange d'acétonitrile/eau (85/15, v/v) à un débit de 0,24 ml par minute. Elle est ensuite conditionnée pendant 30 minutes par passage de la phase mobile utilisée pour l'analyse à un débit de 0,8 ml par minute lors de l'utilisation en mode isocratique. En mode gradient, la colonne est conditionnée pendant 30 minutes par passage de la phase A à un débit de 0,5 ml/min puis un premier cycle est réalisé. Après ces étapes de préparation de la colonne chromatographique, l'analyse des échantillons peut débuter. Des standards externes, correspondant à des solutions de mycotoxines pures, sont injectés intercalés dans la série d'échantillons.

4.5 Analyse en spectrométrie de masse

4.5.1 Principe

La contribution de la spectrométrie de masse aux connaissances actuelles en biologie reste encore relativement modeste. Cependant, la spectrométrie de masse en mode électrospray (ESI pour *Electro Spray Ionization*) est maintenant considérée comme essentielle dans ce domaine. Bien que le mécanisme de l'électrospray ne soit pas encore bien élucidé, le processus peut être simplement décrit. Une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse.

Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée). L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant. De plus, un flux de gaz (de l'azote en général) peut être appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant. Certaines interfaces sont aussi chauffées. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs, c'est-à-dire un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé.

L'analyseur permet de filtrer les ions en fonction de leur rapport m/z. Différents types d'analyseurs existent, comme les analyseurs quadripolaire ou en temps de vol. Nous avons utilisé un analyseur à piège à ions.

4.5.2 Description du système.

Les analyses par spectrométrie de masse (MS) ont été réalisées sur un spectromètre de masse LCQ à piège à ions (« *Ion Trap* » IT) (Finnigan MAT, San Jose, USA) doté d'un système d'ionisation par nano-électronébulisation (« *Electrospray ionisation* » ESI). Les analyses par nano-ESI-IT-MS sont réalisées avec une source de nano-ESI commerciale (The Protein Analysis Co., Odense, Denmark)

utilisant des capillaires en verre (The Protein Analysis Co.). Ces capillaires sont positionnés, grâce à un stéréomicroscope, à une distance d'environ 1mm du trou d'entrée du capillaire de transfert chauffé. Les capillaires sont recouverts de palladium et d'or pour le contact électrique. Les capillaires de verre sont remplis avec 5µL de la solution à analyser. En mode nano-ESI, aucun gaz nébuliseur n'est requis. Pour l'analyse, le voltage de l'aiguille de nano-ESI est fixé à 700V et le capillaire de transfert est chauffé à 150°C. Toutes les expériences ont été réalisées en utilisant la fonction "Automatic Gain Control" (AGC) grâce à laquelle le temps d'accumulation est automatiquement ajusté par l'enregistrement de l'abondance en ion (maximum 800ms). Le logiciel d'acquisition des données utilisé est Xcalibur 1.2 de ThermoQuest (San Jose, USA).

4.5.3 Préparation des échantillons pour l'analyse en nano-ESI-IT-MS

La préparation de l'échantillon est *a priori* simple: le composé à analyser doit être dissout à une concentration de 0,01 à 10 pmol/µl dans un solvant de type méthanol. Il est possible pour améliorer l'ionisation et donc le niveau de détection d'ajouter 3 à 5% (v/v) d'acide acétique (ou 1% d'acide formique) pour le mode positif ou 5 à 50 mM d'acétate d'ammonium (ou en présence de NH_4OH), pour le mode négatif. De nombreux solvants organiques sont compatibles avec l'ESI. Cependant les tensioactifs, les substances non volatiles, et les sels sont très mal tolérés. Les sels perturbent le processus d'électrospray et forment une série d'adduits de type M^+Na^+ , M^+K^+ , $\text{M}^+\text{H}^+\text{Na}^{2+}$, etc., ce qui complique le spectre et diminue la sensibilité. Les débits dans le capillaire d'injection sont de l'ordre du nl/min pour le nano-ESI. Il est donc important de disposer d'échantillons dépourvus de sels et de débris qui pourraient rapidement boucher le capillaire.

4.5.4 Conditions d'analyse de l'OTA et de ses métabolites

L'OTA a été analysée en mode négatif, le spectre complet est réalisé sur l'intervalle m/z [100-500], en MS^2 sur m/z [120-500], et en MS^3 sur m/z [100-400]. L'isolement de l'ion de l'OTA standard se fait à l'intérieur de 1 m/z , l'énergie de collision est de 30% en MS^2 et de 35% en MS^3 , l'activation Qz de 0,25ms et le temps d'activation de 30ms.

La fragmentation des dérivés de l'OTA a été étudiée par Faucet-Marquis (2005). Nous avons recherché dans les solutions ozonées la présence de ces différents dérivés par comparaison des fragments.

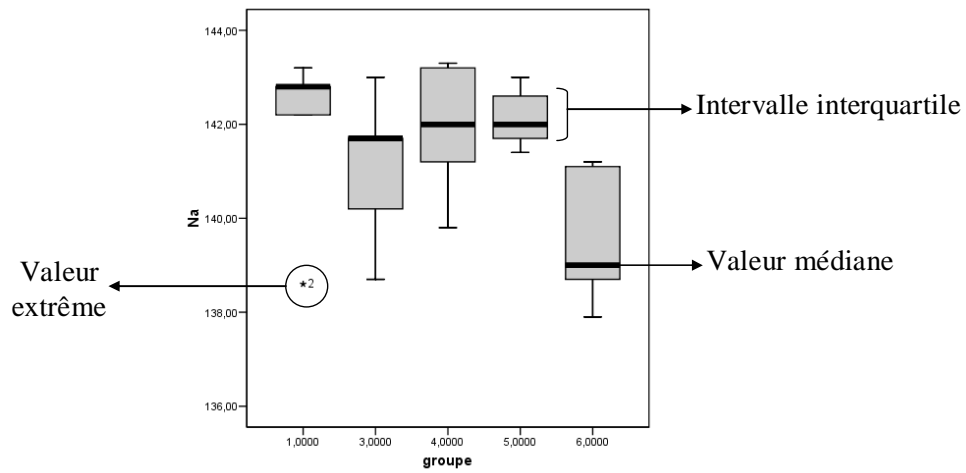
L'OP-OA a été analysée en mode ion négatif, le spectre de masse complet est réalisé sur la fenêtre m/z [100-800], en MS^2 sur m/z [115-300] et en MS^3 sur m/z [90-350]. L'isolement de l'ion de l'OP-OA standard se fait à l'intérieur de 1 m/z , l'énergie de collision est de 55% en MS^2 et de 60% en MS^3 , l'activation Qz de 0,25ms et le temps d'activation de 30ms.

L'OTB a été analysée en mode ion négatif, le spectre de masse complet est réalisé sur la fenêtre m/z [100-700], en MS^2 sur m/z [100-400] et en MS^3 sur m/z [85-330]. L'isolement de l'ion de l'OTB standard se fait à l'intérieur de 1 m/z , l'énergie de collision est de 60% en MS^2 et de 60% en MS^3 , l'activation Qz de 0,25ms et le temps d'activation de 30ms.

4.6 Traitement des données par le logiciel de statistiques

Les données obtenues concernant le gain de poids des rats, le poids relatif des organes, la concentration sérique en OTA, la concentration urinaire en OTA et la quantité d'adduits à l'ADN rénal et hépatique, ont été analysées avec le logiciel SPSS 13.0.

Les résultats sont présentés sous forme de diagramme en boîte à moustache. Les boîtes à moustache affichent la valeur médiane du groupe, les intervalles interquartiles, les quartiles supérieurs et inférieurs ainsi que les valeurs extrêmes. Une valeur est considérée comme extrême par le logiciel statistique, et non représentative du groupe, quand celle-ci est éloignée des autres valeurs de plus de deux fois l'intervalle interquartile. Un exemple de boîte est présenté ci-dessous.



Grphe 4. : exemple de diagramme en boîte à moustache, généré par le logiciel SPSS faisant apparaître la valeur médiane, l'intervalle interquartile ainsi que les valeurs extrêmes des résultats obtenus pour chacun des différents groupes.

Résultats

Chapitre 1 : le procédé Oxygreen® pour l'élimination des mycotoxines présentes sur une matrice simple ou complexe

Le blé est à la base de l'alimentation humaine et animale, que celui-ci soit consommé sous forme brute ou transformée (pain, pâtes, biscuits). Les nutritionnistes attirent l'attention des consommateurs sur l'intérêt nutritionnel que présente la consommation des couches périphériques du grain. Cependant, c'est également en périphérie du grain que sont concentrés divers polluants chimiques (pesticides, insecticides) ou biologiques comme des bactéries, certaines moisissures et des mycotoxines. La présence de ces mycotoxines dans les denrées alimentaires constitue un risque sanitaire non négligeable, et, est responsable de pertes économiques importantes. Leur présence reste difficilement contrôlable malgré les efforts réalisés pour limiter les contaminations (cf revue bibliographique). Les traitements chimiques ou physiques utilisables à l'heure actuelle ont une efficacité limitée ou leur utilisation s'avère impossible pour le traitement de l'alimentation humaine et animale.

L'un des objectifs du procédé Oxygreen® est l'obtention d'une farine complète, riche en parties périphériques du grain, et dans laquelle la présence de polluants est fortement diminuée. Nous nous sommes intéressés à la destruction de deux mycotoxines qui sont fréquemment retrouvées conjointement dans le blé ou les céréales: l'OTA et la CIT (Abramson *et al*, 1999 ; Molinié, 2004 ; Molinié *et al*, 2005). Ces deux mycotoxines ont isolément un effet toxique non négligeable. De plus, des études montrent qu'elles ont un effet synergique *in vitro*, d'un point de vue potentiel cytotoxique (Molinié, 2004, pour un article général voir Speijers & Speijers, 2004 ; Heussner *et al*, 2006), mais également *in vivo*, sur l'incidence des carcinomes rénaux chez la souris (Sansing *et al*, 1976 ; Kanisawa, 1984b). Ces deux toxines ont été impliquées dans la survenue de la néphropathie endémique des Balkans, et leur présence a été identifiée dans des régions où survient cette néphropathie (Petkova-Bocharova *et al*, 1988 ; Vrabcheva *et al*, 2000).

Ces deux mycotoxines sont très stables et aucun procédé efficace n'est développé pour leur décontamination. L'ozone a déjà démontré un potentiel de destruction d'autres mycotoxines. C'est pourquoi nous avons testé le procédé Oxygreen® pour l'élimination de ces deux toxines. Par ailleurs, l'ozone est déjà utilisé dans le domaine agro-alimentaire entre autres, pour ses propriétés désinfectantes ou pour ses effets sur la maturation des aliments (cf chapitre 4.1.3.2 de la revue bibliographique).

Les résultats obtenus concernant la dégradation de ces mycotoxines, par l'ozone en solution aqueuse, ou, associées à une matrice complexe comme le blé, dans le cadre du procédé Oxygreen®, sont présentés ci-après dans le chapitre 1.

1.1. Description succincte des mycotoxines

1.1.1 L'Ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA) est décrite en détail au chapitre 2 de la revue bibliographique.

1.1.2 La Citrinine

La citrinine (CIT) est un métabolite secondaire qui a été isolé pour la première fois à partir de *Penicillium citrinum* (Hetherington & Raistrick, 1931). Elle a tout d'abord été identifiée en temps qu'antibiotique pour ses propriétés bactéricides vis-à-vis des bactéries à Gram positif (Raistrick & Smith, 1941 ; Timonin & Rouatt, 1944). Cependant, sa toxicité a empêché son utilisation en médecine humaine (Ambrose & De Eds, 1945, 1946).

La citrinine est un polykétide, composé d'une unité coumarique. Elle est de couleur jaune et sa formule chimique est l'acide 4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-triméthyl-6-oxo-, (3Rtrans)-3H-2-Benzopyran-7-carboxylique. Sa structure, rappelée ci-après (figure 14) présente des similitudes avec celle de l'OTA.

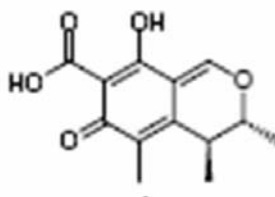


Figure 14. : structure chimique de la CIT

La citrinine est soluble dans les solvants organiques et polaires. Elle se dégrade en solution aqueuse, elle est thermo-labile à des températures supérieures à 80°C. Pour des températures supérieures à 100°C, la citrinine H₁, composé cytotoxique, peut se former par liaison de deux molécules de citrinine (Trivedi *et al*, 1993). La citrinine H₂, peut également être formée par ouverture du cycle (Hirota *et al*, 2002).

1.2 Décontamination d'une solution aqueuse d'OTA et/ou de CIT par l'ozone

L'efficacité de l'ozone, pour l'élimination des mycotoxines, a tout d'abord été évaluée sur des solutions aqueuses de mycotoxines pures. Dans le cadre de cette étude, nous avons testé la capacité de l'ozone pour la destruction de l'OTA, ainsi que pour celle de la CIT. Nous nous sommes également intéressé aux éventuels dérivés formés après ozonation de ces solutions contaminées. La cinétique de dégradation de ces mycotoxines, ainsi que la cinétique d'apparition d'éventuels produits néoformés sont présentées ci-après.

1.2.1 Montage, production de l'ozone et mode d'action de l'ozone

1.2.1.1. Description du montage

Le montage utilisé pour l'ozonation des solutions contaminées en mycotoxines est présenté ci-dessous sur la figure 15.

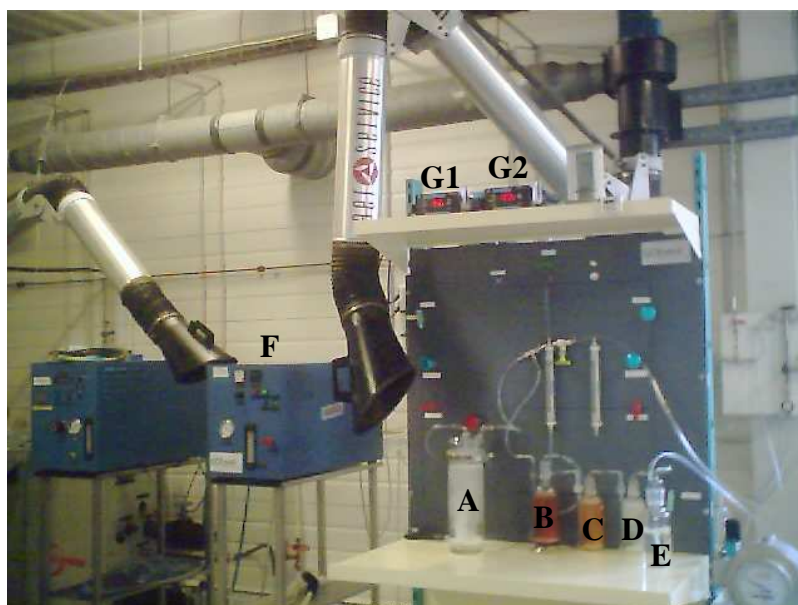


Figure 15. : montage utilisé pour le traitement des solutions contaminées en mycotoxines par l'ozone.

La solution aqueuse, contaminée en mycotoxines, est disposée dans un barboteur de 2 litres identifié sur la photographie par la lettre A. L'ozone, produit par l'ozoneur (élément F) à partir d'oxygène pur, est entraîné par le gaz vecteur (Oxygène pur) dans la solution aqueuse. Le verre fritté disposé en fond du barboteur engendre la formation de fines bulles ascendantes qui permettent une ozonation homogène de cette solution aqueuse. L'ozone excédentaire n'ayant pas réagi avec la solution de mycotoxines est entraîné par le gaz vecteur vers un second barboteur contenant une solution d'iodure de potassium (élément B).

La quantité d'ozone consommée au niveau du barboteur contenant les mycotoxines est suivie en permanence grâce à deux analyseurs BMT 963 (éléments G1 et G2) donnant la concentration en ozone dans le gaz vecteur à l'entrée et à la sortie du premier barboteur.

Par la suite, le gaz est entraîné dans des barboteurs contenant successivement une solution d'acide (élément C), une solution basique (élément D) et de l'alcool (élément E). Au terme de ces barbotages, la totalité de l'ozone est détruite. Par ailleurs, seule une faible part de l'ozone, produit par l'ozoneur, est acheminée vers le barboteur. L'ozone non utilisé pour le barbotage est dirigé vers un four à 350° afin d'y être détruit. Au terme de chaque expérience, l'ensemble du matériel est placé dans de l'eau de javel à 13% afin d'éliminer toute trace résiduelle de mycotoxines.

Au cours de cette expérience, la solution aqueuse de mycotoxines est traversée par le gaz vecteur à un débit de 0,1 m³/h. La concentration en ozone dans le gaz vecteur est de 90g d'O₃/m³ d'O₂. L'ozonation de ces solutions est réalisée jusqu'à ce qu'une quantité de 20g d'ozone ait été appliquée par litre de solution aqueuse, soit pendant environ 4 heures.

1.2.1.2. Production de l'ozone par l'ozoneur

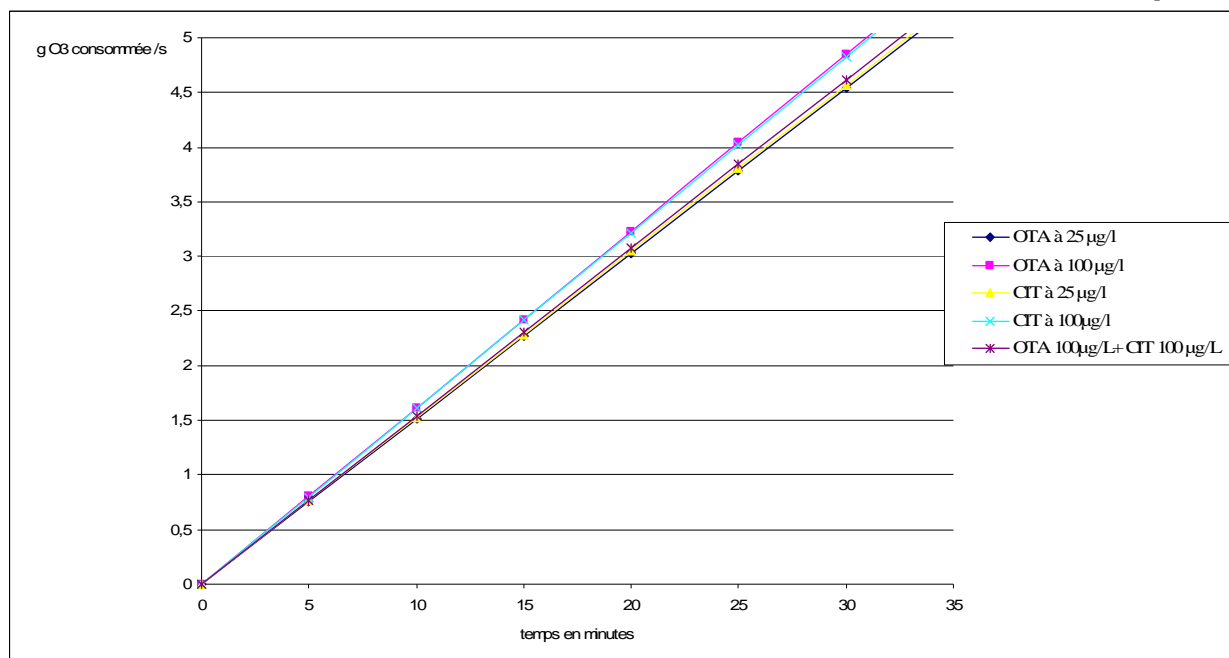
Dans le cadre du procédé Oxygreen®, l'ozone est produit *in situ* dans un générateur de configuration tubulaire, en faisant circuler de l'oxygène pur dans un gaz vecteur entre deux électrodes soumises à une différence de potentiel. Par activation électronique lors de son passage dans le champ électrique, l'oxygène se dissocie partiellement sous forme d'oxygène radicalaire, lequel se recombine avec une molécule d'oxygène pour former l'ozone. La capacité de production de l'ozone dépend du voltage, de la fréquence du courant, des propriétés et de l'épaisseur du matériel diélectrique, de l'espace de décharge et de la pression absolue présente dans l'espace de décharge. L'ozoneur utilisé est un ozoneur de marque Ozonia.

1.2.1.3. Description des solutions aqueuses de mycotoxines et échantillonnage

Les solutions pures, contaminées en mycotoxines, ont été obtenues après addition dans de l'eau milliQ - eau déminéralisée ultra purifiée - d'une quantité connue de mycotoxine dissoute dans de l'éthanol absolu. La part d'éthanol dans la solution aqueuse est de 0,1 pour mille. La décontamination par l'ozone a été testée sur deux concentrations en chacune des deux mycotoxines, ainsi que sur une solution contenant un mélange de ces deux toxines. Les concentrations choisies sont 100µg et 25µg de mycotoxines par litre de solution aqueuse. L'ozonation est réalisée sur deux litres de cette solution et des aliquots de 10 ml de solution ozonée sont prélevés à la pipette, après ouverture du barboteur toutes les cinq minutes.

1.2.1.4 Mode d'action de l'ozone et consommation de l'ozone par les solutions au cours du temps

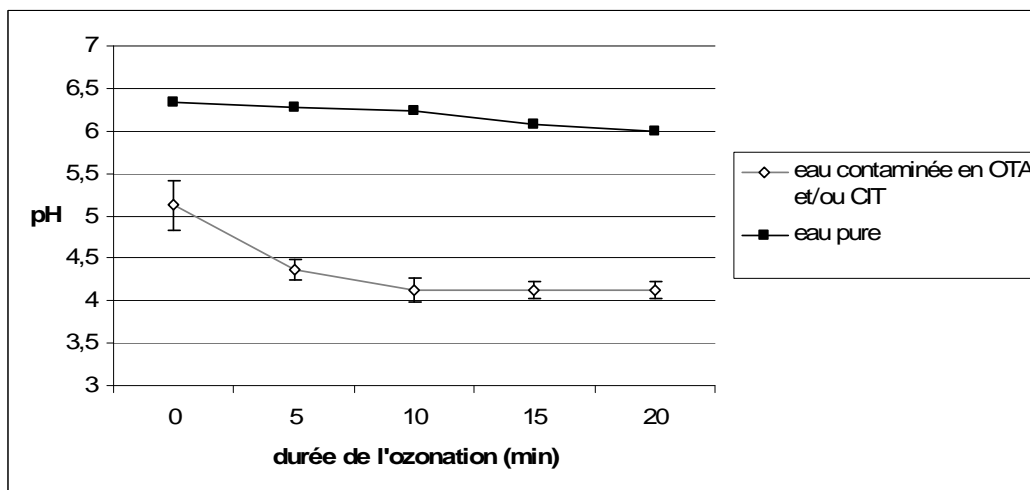
L'action de l'ozone en phase liquide dépend de sa concentration dans le gaz vecteur, de la pression d'application de l'ozone, de la taille et de la vitesse ascensionnelle des bulles, de l'hydrodynamique à l'interface gaz-liquide, de la température et du pH du liquide. L'ozonation en solution est réalisée à température ambiante, dans de l'eau milliQ et à pH légèrement acide. La consommation d'ozone par la solution aqueuse, en fonction de la durée du traitement et en fonction de la concentration de la solution en l'une ou l'autre des mycotoxines, est présentée sur le graphe 5.



Graph 5. : consommation d'ozone en g/secondes par les solutions de mycotoxines au cours du traitement.

La consommation d'ozone au niveau du barboteur est linéaire au cours du temps. On constate qu'une quantité d'ozone légèrement supérieure est consommée au cours du traitement des solutions contenant 100µg de mycotoxines par rapport à celle n'en contenant que 25µg. On n'observe pas de variation de la consommation d'ozone liée au type de mycotoxine traitée.

Au cours du traitement de cette solution aqueuse par l'ozone, une acidification de la solution est constatée sur les prélèvements effectués comme présenté sur le graphe 6 ci-après.



Graph 6. : évolution du pH moyen des diverses solutions ozonées en fonction de la durée de l'ozonation.

Aucune variation du pH n'est observée quand la solution ozonée est de l'eau pure. L'addition des toxines dans l'eau conduit à une acidification de celle-ci par rapport à une eau non contaminée. Cette baisse du pH s'amplifie au cours de l'ozonation des solutions contaminées en mycotoxines, OTA ou CIT, à 25 ou 100µg/l. La baisse du pH au cours de l'ozonation est très prononcée lors des 5 premières minutes du traitement à l'ozone où l'on constate une diminution du pH comprise entre 0,5 et

0,9 unités de pH. Par la suite, le pH de la solution ozonée se stabilise aux alentours de 4,1. Ceci s'explique par la formation de diacide dont le pH est de 4.

1.2.2 Cinétique de dégradation des mycotoxines en solution

1.2.2.1 Analyse par HPLC de la concentration résiduelle en mycotoxines

1.2.2.1.1 Principe de l'analyse par HPLC

La Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est une méthode d'analyse physico-chimique qui permet la séparation d'un ou de plusieurs composés, contenus dans un mélange, par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire. La méthode chromatographique utilisée pour la séparation et la caractérisation des mycotoxines est la chromatographie d'adsorption en phase inverse. La phase stationnaire est constituée de silice greffée de groupements octadéciles apolaires. La phase mobile est par contre hydrophile et polaire. Les séparations sont fondées sur les interactions hydrophobes entre les composés à séparer et la phase stationnaire. Ainsi, plus un composé est apolaire et plus il sera retenu sur la phase stationnaire. La phase mobile utilisée est la phase « Molinié » décrite au paragraphe Matériel et Méthode. Un détecteur spectrofluorimétrique placé en sortie de colonne permet de déceler le passage de chacune des substances et de les quantifier.

1.2.2.1.2 Résultats de l'analyse par HPLC

La quantité de mycotoxines présente dans la solution aqueuse traitée à l'ozone a été déterminée sur les prélèvements effectués toutes les 5 minutes. Les solutions ont directement été analysées par HPLC, sans étape d'extraction ou de concentration des solutions.

Durée de l'ozonation (min)	Concentration de la solution aqueuse en OTA et/ou en CIT				
	CIT 25µg/l	CIT 100µg/l	OTA 25µg/l	OTA 100µg/l	OTA 100µg/l + CIT 100µg/l
0	25,3	100	24,14	100	OTA : 100 ; CIT : 100
5	<Ldd	<Ldd	0,743	0,763	OTA : 2,874 ; CIT : <Ldd
10	<Ldd	<Ldd	0,303	0,597	OTA : 1,350 ; CIT : <Ldd
15	<Ldd	<Ldd	0,176	0,17	OTA : 0,699 ; CIT : <Ldd
20	<Ldd	<Ldd	<Ldd	<Ldd	<Ldd

tableau 9. : Concentration résiduelle en OTA et en CIT dans les solutions aqueuses traitées à l'ozone. <Ldd : inférieur à la limite de détection

La totalité de la CIT est dégradée dès 5 minutes de traitement à l'ozone, quel que soit le taux de contamination testé. Au terme de ces 5 minutes de traitement, le taux cumulé d'ozone appliqué est de 0,4 g d'O₃/litre de solution. Pour l'OTA, après 5 minutes de traitement à l'ozone, on observe une réduction de la contamination d'un taux supérieur à 90%. Après 20 minutes de traitement, ce qui correspond à l'application de 1,6g d'O₃/litre de solution, la totalité de l'OTA est dégradée. Les essais menés sur les solutions co-contaminées en OTA et en CIT ne révèlent pas de modification de la cinétique de dégradation de la CIT. Par contre, l'efficacité de destruction de l'OTA est légèrement réduite. En effet, après 5 minutes de traitement, la quantité d'OTA non détruite est d'environ 2,9µg/l dans le cas de l'ozonation de la solution d'OTA et CIT alors qu'il ne reste plus que 0,74µg/l dans le cas de la solution d'OTA. L'analyse par HPLC de ces solutions n'a pas permis de détecter de dérivés de l'OTA ou de la CIT dans les solutions de mycotoxines ozonées.

Les solutions contaminées en OTA et en CIT ont été soumises à l'application d'un flux d'oxygène dans les mêmes conditions de débit que celles ayant servi au traitement Oxygreen® de celles ci l'ence que la disparition des mycotoxines est bien due à la phase mobile. stationnaire phase mobile d. Quand le gaz appliqué est de l'oxygène pur, et non de l'ozone, on constate que la

concentration en OTA reste constante. Par conséquent, la disparition des mycotoxines est bien liée à l'action de l'ozone sur la mycotoxine.

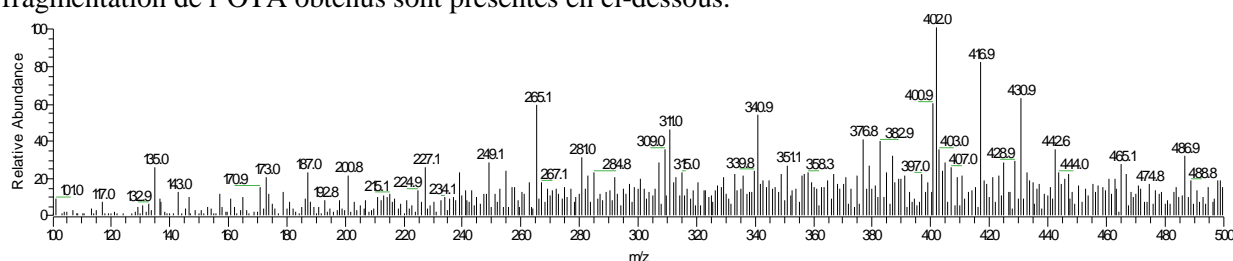
1.2.2.2 Analyse en spectrométrie de masse

1.2.2.2.1 Principe de la spectrométrie de masse

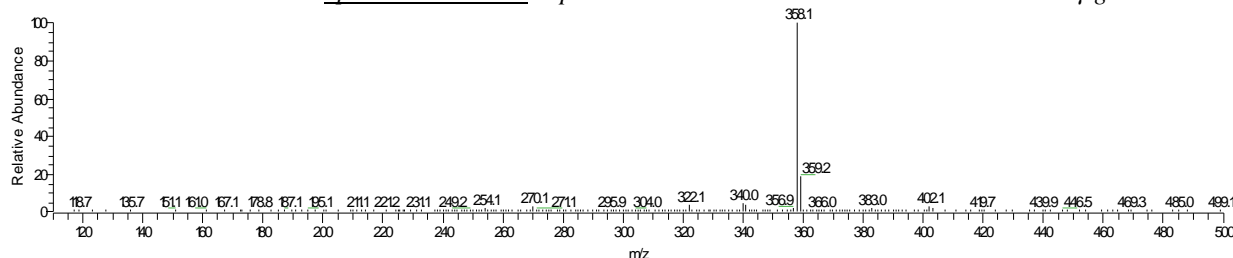
La technique est décrite en détail dans la partie Matériel et Méthode au paragraphe 4.5.

1.2.2.2.2 Résultats de l'analyse en spectrométrie de masse

Nous avons effectué l'analyse de la solution contaminée en OTA par spectrométrie de masse afin de : (i) prouver par une seconde méthode d'analyse la disparition de l'OTA (ii) tenter de mettre en évidence l'apparition des produits de dégradation après le traitement à l'ozone. Les spectres de fragmentation de l'OTA obtenus sont présentés en ci-dessous.



Spectre de masse 1 : spectre de masse de la solution contaminée à 100µg/l en OTA



1.2.3 Conclusion

L'application de l'ozone sur une solution aqueuse de mycotoxines permet une destruction efficace de ces mycotoxines sans génération de métabolites secondaires identifiables ni par HPLC ni par spectrométrie de masse. Cette observation est en accord avec les études menées précédemment sur la dégradation en solution de l'OTA et de la CIT. Mac Kenzie *et al* (1997) n'ont identifié aucun produit néoformé visible par détection UV ou fluorimétrique. L'OTA nécessite une quantité d'ozone plus importante que la citrinine pour être totalement dégradée.

Nous avons constaté que la dégradation des mycotoxines en solution aqueuse s'accompagne d'une acidification de la solution ce qui suggère une dégradation complète des mycotoxines sous forme d'éléments simples tels que de l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide nitrique (HNO₃), de l'acide carboxylique et/ou du dioxyde de carbone (CO₂). En outre, cette acidification peut résulter de la l'apparition de la forme di-acide de l'OTA. Cette dernière hypothèse est en cours de vérification.

L'efficacité de l'ozone pour l'élimination de l'OTA présente dans une solution aqueuse est démontrée. La dégradation de la CIT en solution aqueuse est plus rapide que celle de l'OTA.

1.3 Décontamination de l'OTA présente sur une matrice complexe

Le but de ce travail est d'étudier la dégradation de l'OTA associée à une matrice complexe : le blé. Au vu des résultats obtenus en solution aqueuse, les quantités d'ozone qui seront nécessaires à la dégradation de l'OTA sur le blé, seront également suffisantes pour l'élimination de la CIT,. Des quantités supérieures d'ozones devront être appliquées pour décontaminer une matrice plus complexe, l'ozone pouvant réagir avec beaucoup d'autres éléments de cette matrice.

1.3.1 Action de l'ozone sur le blé

L'action de l'ozone sur le blé se décrit comme une réaction de type gaz/solide. Celle-ci dépendra de la structure du solide, de son rapport surface-volume, de la structure physique de la périphérie du solide accessible à l'ozone, de sa composition chimique ainsi que de son taux d'humidité. Le grain de blé a une structure oblongue et est fendu en son milieu par un sillon longitudinal. Pour l'obtention de résultats reproductibles, les grains de blé cassés, et les petits grains de taille inférieure à 5mm, sont éliminés par tamisage. En fonction du taux d'humidification et du laps de temps entre l'humidification et l'application du traitement Oxygreen®, l'action de l'ozone sera circonscrite aux parties périphériques du grain ou pénétrera de façon plus prononcée jusqu'à atteindre la couche à aleurone, et voire l'albumen. La pénétration de l'ozone lors d'une ozonation en conditions dites « sèches » et en conditions dites « humides », c'est-à-dire après humidification du grain et respect d'un certain délai entre le moment de l'humidification et celui de l'ozonation, est présentée sur la figure 16.

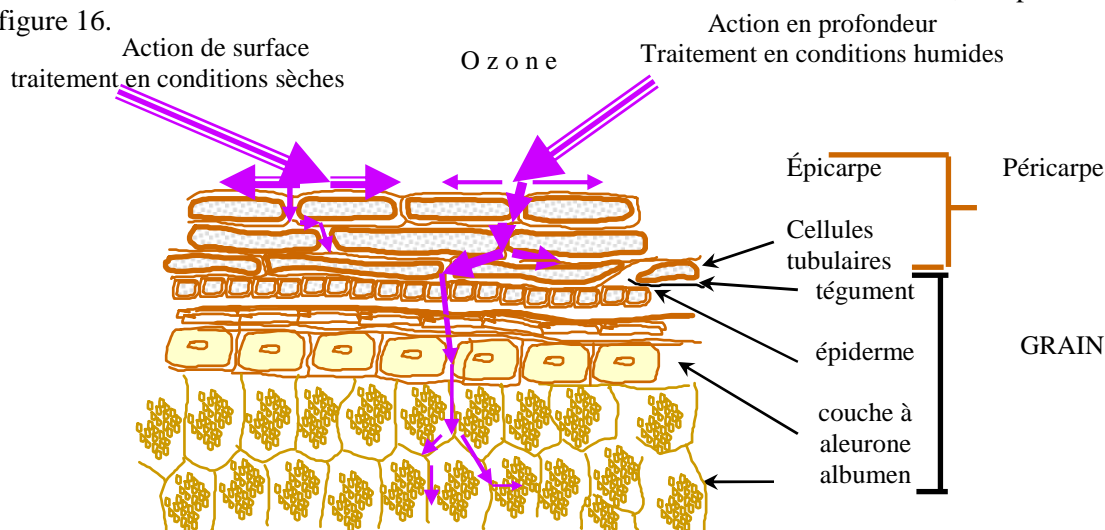


Figure 16. Pénétration de l'ozone en fonction de la pré-humidification du grain. Adapté de P. Feillet, 2000.

Les grains de blé traités à l'ozone ont un taux d'humidité de 13%. En conditions sèches, le blé est humidifié entre 2 et 4% massique et immédiatement traité à l'ozone. En conditions humides, le blé est humidifié à un taux de 2% massique suivi d'une période d'attente de 2 heures au minimum. Une seconde humidification (2% massique) est réalisée, et est suivie directement du traitement à l'ozone. Il existe donc une gamme de possibilités, entre un traitement surtout périphérique et un traitement qui a pour but d'agir en profondeur.

1.3.2 Traitement par le procédé Oxygreen® du blé

1.3.2.1 Description du système

Les grains de blé sont traités par l'ozone en utilisant un pilote Oxygreen® schématisé ci-après (Figure 17).

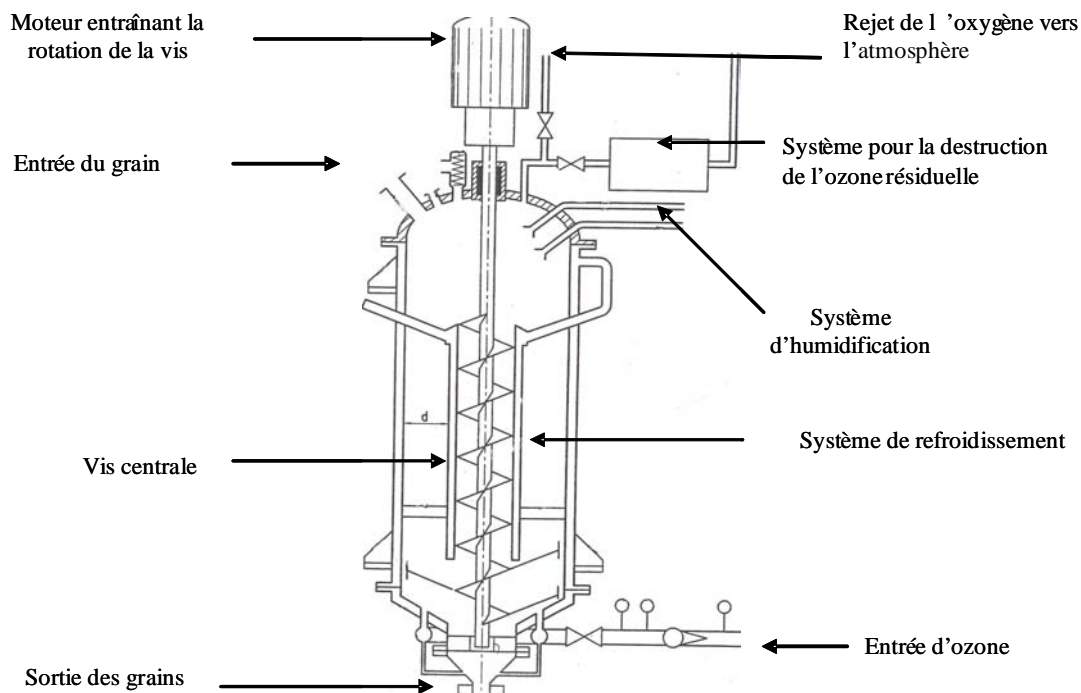


Figure 17. : Schéma du réacteur dans lequel sont placés les grains de blé en vue de leur ozonation. Adapté du Brevet N° FR 9915955

Le procédé Oxygreen® permet le traitement à l'ozone des grains de blé ou d'autres céréales, avant mouture, en réacteur confiné, selon un procédé dit de « batch séquentiel continu » (carrousel de réacteurs). Dans un réacteur pilote fermé, les grains sont mis en mouvement à l'aide d'une vis d'Archimède sans fin, centrale, chemisée, de façon à obtenir un contact intime et homogène entre l'ozone et les grains. Ce réacteur pilote a été calculé de telle sorte qu'il soit possible, à l'aide de nombres adimensionnels, de procéder à l'extrapolation directe vers des outils industriels. L'ozone, fabriqué *in situ*, à partir d'oxygène, est introduit, en mouvement ascendant, au bas du réacteur par un dispositif spécial. La masse de grains à traiter est elle-même animée d'un mouvement descendant. La conjonction de ces deux mouvements permet un traitement homogène de tous les grains. D'une façon générale, il a été constaté que la décontamination des grains est d'autant plus efficace que le renouvellement de la surface d'échange grain-ozone est intense. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir un brassage efficace des grains et d'avoir un taux de recirculation de ceux-ci dans la zone de traitement optimisé. Ce taux de recirculation dépend essentiellement du pas de la vis sans fin, de son taux de remplissage lequel est lui-même fonction de la taille des grains et de sa vitesse de rotation. Les paramètres choisis pour cette expérimentation sont précisés dans le paragraphe 1.3.2.2. Après réaction, l'ozone résiduel est évacué par le haut du réacteur pour être détruit par chauffage à 350°C. La réaction d'ozonation étant exothermique, le corps du réacteur est mis en contact avec un système de

refroidissement permettant de maintenir une température constante à l'intérieur de celui-ci. De nombreux paramètres de réglage permettent de moduler l'effet de l'ozone sur le grain, en fonction des objectifs visés.

1.3.2.2 Paramètres choisis

Les paramètres optima pour le traitement du blé ont été étudiés et déterminés par l'équipe Oxygreen® de la société Goëmar. Ces paramètres ont été déterminés de façon à permettre une réduction correcte du taux de mycotoxines, tout en conférant à la farine issue de ce grain ozoné des propriétés technologiques intéressantes. Les principaux paramètres étudiés concernant le grain sont :

- le nettoyage des grains
- la pré-humidification
- le taux d'humidification
- le laps de temps à respecter entre humidification du grain et ozonation de celui-ci
- le pH de l'eau utilisée pour humidifier le grain
- l'ozonation préalable de l'eau utilisée pour réaliser l'humidification

Les paramètres de l'ozonation définis sont :

- la nature du gaz vecteur
- la concentration en ozone dans le gaz vecteur
- le débit du gaz vecteur
- la vitesse de rotation de la vis centrale assurant le renouvellement de la surface de contact entre le grain et l'ozone.

D'autres paramètres tels que le rapport entre le diamètre de la vis et celui du réacteur, le rapport entre le pas de la vis et son diamètre, ou le rapport entre la hauteur totale du réacteur et son diamètre, ont également leur importance pour une ozonation optimale.

L'ozonation des grains est effectuée à température ambiante, sur des lots de blé propres qui ont été débarrassés de leurs impuretés (pierres, brindilles, métaux) ainsi que des grains cassés sur un séparateur. Après nettoyage, 8 kilos de grains sont placés dans le réceptacle. L'humidification des grains à un taux d'humidité de 4% en poids est réalisée avec de l'eau ultrapure, non ozonée, à pH 7. Aucun délai entre l'humidification des grains et leur ozonation n'est appliqué (conditions sèches). Cependant, sur le pilote de laboratoire, la maîtrise de ce temps est incomplète, car l'humidification est réalisée manuellement par le haut du réacteur ouvert. Pour les essais de décontamination en mycotoxines des grains de blé, le taux d'ozone choisi est de 5 g d'ozone par kilo de grain, le gaz vecteur utilisé est de l'oxygène pur. La concentration en ozone dans le gaz vecteur est de 89 g d'O₃ par m³ d'oxygène. La pression du gaz vecteur ozoné dans le réacteur est de 1,3 bars.

1.3.3. Décontamination en OTA du blé par le procédé Oxygreen®

1.3.3.1 Description des lots de blé utilisés pour l'étude

Le procédé Oxygreen® a été appliqué sur différents lots de blé afin d'en réduire la charge en OTA. Un lot de blé provenant du Nord de l'Île de France a été fractionné en 5 sous lots. Le code adopté pour ces lots de blé est OXBM 01. pour **Oxygreen® Blé Mycotoxine 2001**, l'année 2001 correspondant au moment où le procédé a été expérimenté pour sa décontamination en mycotoxines du blé. Il s'agissait de la récolte de l'été 2000.

Le premier sous-lot n'a pas été sur-contaminé en mycotoxines. Ce sous-lot, non sur-contaminé, a été scindé en deux parties. Une des deux a été traitée par le procédé Oxygreen®.

Les autres sous lots de blé ont été artificiellement contaminés en OTA aux concentrations respectives de 2,5 ; 7 ; 40 et 100 microgrammes par kilos de blé. La contamination en OTA du blé a été réalisée par addition de la mycotoxine solubilisée dans de l'éthanol sur le blé. L'éthanol a été dilué dans de l'eau afin que la quantité additionnée corresponde à 1% massique de la quantité de blé. L'homogénéisation de la contamination a été assurée par un brassage continu du grain pendant la phase de contamination. Les différents lots de blé sont décrits sur la figure 18 ci-dessous lot de blé ci-dessous.

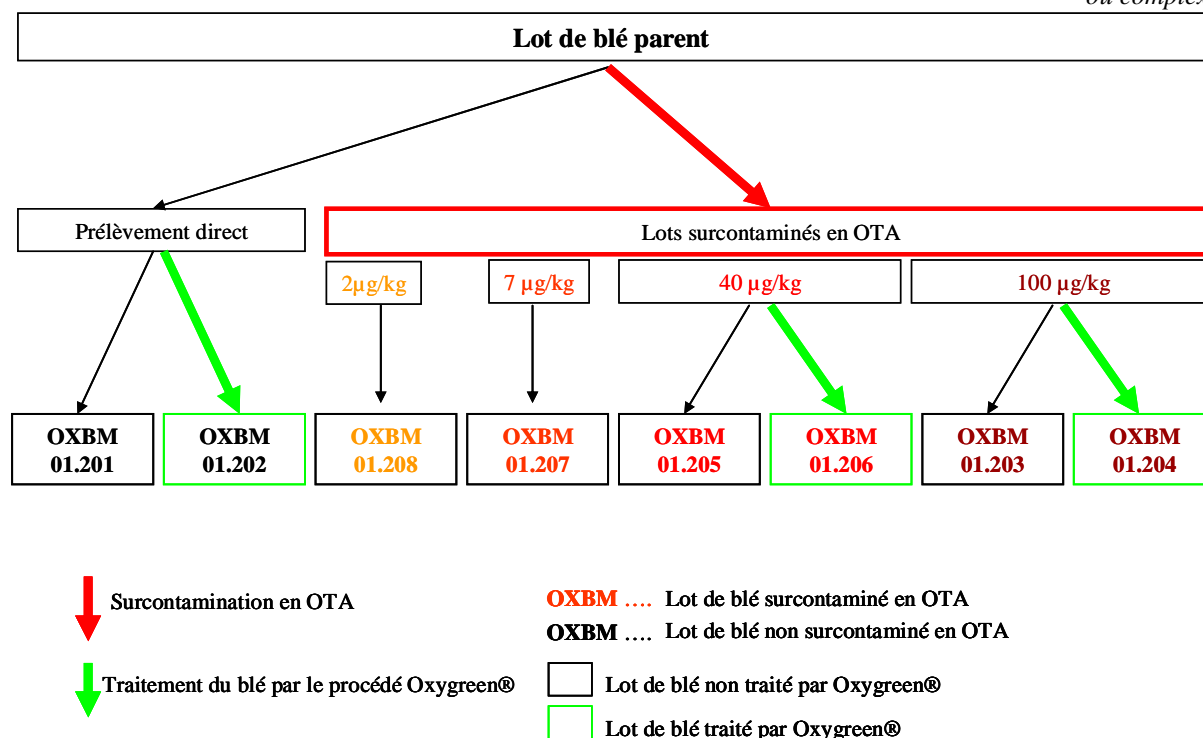


Figure 18. : Description des différents lots de blé entrant dans cette étude. Rappel des codifications des différents lots de blé, de leur taux de contamination en OTA et du traitement subi.

1.3.3.2 Potentiel décontaminant du procédé Oxygreen®

L'OTA a été extraite selon le protocole d'extraction de l'OTA décrit dans la partie matériel et méthode. Le protocole utilisé est une extraction par partage de phase liquide-liquide. Cette méthode d'extraction est fondée sur les changements d'ionisation de la molécule en fonction du pH ; son état d'ionisation définira son affinité pour une phase organique ou pour une phase aqueuse. Cette méthode présente l'avantage de permettre l'extraction simultanée de plusieurs mycotoxines. Ainsi, ce protocole nous permet d'extraire l'OTA du blé mais également les métabolites de l'OTA. De plus, le rendement d'extraction par cette méthode est linéaire quel que soit le niveau de contamination en OTA. La présence de composés naturellement présents dans la matrice n'interfère pas avec le rendement d'extraction. Divers composés sont co-extraits avec la mycotoxine d'intérêt, notamment des pigments. Il est par conséquent nécessaire de définir des conditions d'analyse à l'HPLC de l'extrait qui permettent par la suite de séparer les composés « indésirables » co-extraits avec l'OTA de l'OTA. L'extraction de l'OTA sur les divers lots de blé a permis d'établir précisément les concentrations en OTA des différents lots (cf tableau 10).

Lot de blé initial	OXBM 01.201	OXBM 01.205	OXBM 01. 203
Taux de contamination initial théorique (µg/kg)	0	40	100
Taux de contamination initial réel (µg/kg)	0,5±0,15	37,6 ± 4,8	96 ±1,4
Lot de blé après traitement Oxygreen®	OXBM 01.202	OXBM 01.206	OXBM 01.204
Taux de contamination résiduel (µg/kg)	0,25±0,1	11,1±3,8	44,7±5,1
% de décontamination	50	69,4 ±14	53,4±4,6

tableau 10. : taux de contamination en OTA des différents lots de blé, taux résiduel d'OTA sur les lots de blé décontaminés et % de décontamination.

Les lots de blé entrant dans cette étude étaient théoriquement « propres » et exempts de mycotoxines. Cependant, l'extraction de l'OTA sur ces différents lots de blé a mis en évidence la présence d'une contamination naturelle sur le lot de blé témoin. En effet, le lot de blé OXBM 01.201, non sur-contaminé en OTA, contient environ 0,5µg d'OTA/kg de blé. La CIT, fréquemment associée à l'OTA dans des contaminations naturelles des céréales a également été recherchée : aucune contamination en citrinine n'a été détectée.

Les lots de blé artificiellement contaminés en OTA le sont, à peu de chose près, aux taux annoncés. Ainsi le blé OXBM 01.203 est contaminé à $96 \pm 1,4\mu\text{g}$ d'OTA/kg et le lot OXBM 01.205 à $37,6 \pm 4,8\mu\text{g}/\text{kg}$. Deux autres lots de blé non présentés dans le tableau 17 contaminés artificiellement à 2,5 (OXBM 01.208) et 7µg/kg (OXBM 01.207) sont contaminés réellement à $1,6 \pm 0,6$ et $6,5 \pm 1,8\mu\text{g}$ d'OTA/kg.

La quantification des concentrations en OTA de ces divers lots de blé a également été réalisée par un laboratoire extérieur, l'institut Français de la Brasserie et de la Malterie (IFBM) utilisant une méthode de purification de l'OTA par colonne d'immunoaffinité. Les résultats obtenus sont présentés tableau 11.

Lot de blé	OXBM 01.201	OXBM 01.202	OXBM 01.203	OXBM 01.204	OXBM 01.205	OXBM 01.206	OXBM 01.207	OXBM 01.208
Taux d'OTA µg/kg de blé	Ldq	Ldq	75,8	33,5	23,8	5,2	3,4	1,6

tableau 11. : résultat de l'analyse du taux de contamination en OTA des différents lots de blé par l'IFBM.

Les résultats obtenus par l'IFBM, faisant appel à une autre méthode d'analyse sont comparables aux nôtres, bien qu'ils soient inférieurs. L'explication vient du fait que l'analyse de l'OTA est réalisée après extraction et purification sur colonne d'immunoaffinité (IAC) sans acidification préalable. En effet, il a été montré dans notre laboratoire que l'utilisation de cette méthode conduit à une sous-estimation de la contamination en OTA, car une partie de l'OTA transformée lors de l'extraction en OP-OTA (forme ouverte) n'est pas retenue sur la colonne d'IAC (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2004 ; Castegnaro *et al*, 2006b). Les taux de décontamination par Oxygreen® déterminés en utilisant les valeurs obtenues par l'IFBM sont identiques à ceux que nous avons calculés : 56% pour la forte contamination en OTA et 79% pour la faible contamination.

L'application du procédé Oxygreen® sur ces trois lots de blé contaminés en OTA (OXBM 01.201 ; OXBM 01.203; OXBM 01.205) permet de nettement réduire la charge en mycotoxines de ces lots de blé. On constate une réduction du niveau de contamination en OTA comprise entre 50 et 80% pour les différents lots de blé d'après notre méthode d'analyse. Le procédé Oxygreen® permet une décontamination efficace des lots de blé, que ceux-ci soient naturellement ou artificiellement contaminés en OTA.

Les conditions d'ozonation utilisées ici ne permettent pas d'éliminer la totalité de la charge en OTA du blé. L'interaction de l'ozone avec d'autres éléments de la matrice entraîne une réduction de l'efficacité de décontamination de celle-ci. Cette réduction de l'efficacité de décontamination en présence de composés organiques a déjà été observée par Mac Kenzie *et al* (1997) lors des essais menés en vue de décontaminer le riz en Aflatoxines.

Bien que les conditions de décontaminations testées permettent une nette réduction du taux de contamination, celles-ci devront être optimisées afin d'améliorer la décontamination en OTA du blé naturellement contaminé. Une humidification plus intense du grain, qui va conditionner l'accessibilité des couches les plus internes du grain à l'ozone, sera étudiée. Par ailleurs, aucun délai entre le moment de l'humidification et celui du traitement Oxygreen® n'a été appliqué. Par conséquent, l'eau et par là même l'action de l'ozone, sont restées à la périphérie du grain. Cette action de surface explique notamment pourquoi le taux de décontamination a été relativement faible dans le cas de la contamination naturelle du blé (seulement 50% alors que le taux d'OTA de départ était très faible). Nous avons également expliqué pourquoi le contrôle de ce paramètre était difficile en conditions de laboratoire. Il pourra être amélioré en conditions industrielles.

Pour la suite de l'étude et ce, afin de simplifier la lecture des résultats, nous considérerons que les lots de blé sont contaminés aux taux qui avaient été annoncés, soit 40µg/kg pour le lot OXBM 01.205 et 100µg/kg pour le lot OXBM 01.203. Ce sont ces taux de contamination qui seront rapportés sur les graphes. Pour le blé témoin supposé ne pas contenir de mycotoxine, le taux de contamination réel sera rappelé, soit 0,5µg/kg de blé.

1.3.4 Influence du traitement Oxygreen® sur la qualité nutritionnelle et sur les propriétés technologiques du blé

1.3.4.1 Incidence sur la qualité nutritive du blé

Le blé constitue une source importante de micronutriments qui n'est actuellement pas exploitée par les procédés de mouture. En effet, ces micronutriments sont concentrés dans la couche à aleurone du blé laquelle est éliminée avec les sons au cours des procédés de meunerie. Ainsi, le type de farine utilisé, et surtout son indice de raffinage, fait varier de façon significative l'apport en nutriments, en fibres et en sels minéraux. La teneur en vitamines peut baisser de 50 à 75% dans une farine blanche par rapport à une farine complète. La teneur en sels minéraux peut varier de 45 à 72%, celle en oligoéléments de 15 à 50% et enfin, la teneur en fibre peut être réduite de 70%.

La teneur en vitamines du blé est une composante très importante de la qualité du blé, en particulier dans le cadre du traitement Oxygreen® qui a pour but de rendre propre à la consommation les parties périphériques du grain de blé et ainsi de fournir un aliment riche en vitamines et micronutriments : il est par conséquent primordial que l'application du procédé n'altère pas de façon significative la teneur en ces éléments.

L'effet du procédé Oxygreen® sur la qualité nutritive du blé a été étudié par l'équipe développant le procédé (Dubois *et al*, 2006). L'évolution de la teneur en vitamines, en lipides et en sucres ainsi que les activités protéolytiques ou lipasiques ont été mesurées. Ces différentes composantes du blé ont été évaluées sur un lot de blé contrôle, non humidifié, sur un lot de blé contrôle humidifié au même taux que celui nécessaire à l'application du traitement Oxygreen® et sur un lot de blé ayant reçu le traitement Oxygreen® au taux de 5g d'O₃ /kg de grain. Cette étude, a permis de conclure que le procédé Oxygreen® ne modifiait pas de façon significative la teneur en protéines, ou en vitamines du blé. La teneur en sucre du blé est accrue de façon très nette ; cette augmentation est majoritairement due à la libération spontanée de maltose, celui-ci résultant d'une consommation de l'amidon de la graine. Cette libération de maltose, glucose et fructose spontanée va pouvoir se substituer à l'addition d' α -amylase lors du procédé de fabrication du pain. En effet, normalement de l' α -amylase est ajoutée dans les pâtes afin de libérer des sucres simples pour faciliter le développement des levures et accélérer le processus de fermentation du pain. Cette libération de maltose, après application du procédé Oxygreen®, constitue par conséquent un atout technologique. Il est également noté une inhibition de l'activité lipasique sans enregistrer de variations concernant le taux et la répartition en acides gras (Dubois *et al*, 2006). L'inhibition de cette activité lipasique et de l'activité d'autres enzymes comme celle de l' α -amylase, de la polyphénol oxydase, de la catalase et de la lipooxygénase (Goëmar, communication personnelle) présente un avantage d'un point de vue technologique en augmentant la stabilité de la farine dans le temps.

1.3.4.2 Incidence sur la qualité technologique du blé

Le blé traité par le procédé Oxygreen® doit permettre l'obtention d'une farine panifiable. Les propriétés technologiques de la farine doivent être conservées. Certaines modifications concernant notamment l'activité des enzymes ou la modification du taux d'amidon peuvent avoir une incidence non négligeable sur les propriétés technologiques de cette farine. L'impact sur la rhéologie de la pâte ainsi que sur la qualité de la panification a été étudié.

Les notes de panification obtenues pour la pâte, la mie et la croûte du pain sont généralement améliorées dans le blé traité par le procédé Oxygreen® par rapport au blé contrôle, et ce d'autant plus que le blé est de qualité médiocre. De même, le volume du pain n'est pas modifié dans le blé traité par le procédé Oxygreen®.

Le début de dégradation de l'amidon en maltose, glucose et fructose va conférer à la pâte un léger goût sucré. Cette libération de sucres simples évite l'adjonction d'amylases communément utilisées en panification. Les variations observées (activités enzymatiques, teneur en sucres) après

traitement Oxygreen® du blé ne sont pas préjudiciables dans la mesure où les notes de panification obtenues lors de la fabrication d'un pain avec une farine Oxygreen® sont améliorées. Par ailleurs, ces modifications confèrent à la farine des propriétés particulières qui pourront être mises à profit pour la confection de produits alimentaires particuliers comme des génoises ou des cakes (cf paragraphe 4.2.3 de la revue bibliographique).

1.4. Conclusion et discussion des résultats du chapitre 1

Le procédé Oxygreen® permet la disparition des molécules CIT et OTA sans que l'on identifie, dans les conditions d'analyse testées, la formation de produits néoformés. La dégradation de ces mycotoxines en solution aqueuse est très rapide et nécessite des doses d'ozone inférieures à 1,6 g/litre de solution.

Ces résultats confirment le potentiel de l'ozone à dégrader des mycotoxines. L'ozone permet en effet la disparition de la moniliformine (Zhang & Li, 1994), de la zéaralénone, des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂, de l'acide cyclopiazonique, de l'ochratoxine A, de la patuline, et de l'acide sécalonique D en solutions aqueuses (Mc Kenzie *et al*, 1997). Le potentiel décontaminant de ce procédé est maintenu sur une matrice complexe telle que le blé, dans les conditions de l'essai. L'OTA est efficacement dégradée à un taux compris entre 50 et 80% de la contamination initiale. L'élimination de certaines mycotoxines par l'ozone a déjà été étudiée sur des matrices complexes. Ainsi, l'élimination du désoxynivalenol a été mise en évidence sur le maïs (Young, 1986) ou celle des aflatoxines présentes sur des cacahuètes (Dwarakanath *et al*, 1967 ; Dollear *et al*, 1968). Cependant, la décontamination des mycotoxines associées à une matrice complexe s'avère plus délicate et nécessite de faire appel à des traitements auxiliaires. Ainsi, l'élimination des aflatoxines sur les cacahuètes nécessite une pré-humidification intense (30%) de celles-ci, ainsi que l'utilisation d'une température élevée (100°C) afin d'obtenir une décontamination satisfaisante. Ces conditions d'ozonation sont très contraignantes, et ne sont pas toujours compatibles avec les procédés de transformation des aliments.

De même, la dégradation des aflatoxines associées à une matrice de maïs a été étudiée. Une suspension de maïs finement broyé a été sur-contaminée par une solution d'AFB ou par de la poudre de riz contaminée en AFB. Il apparaît que les aflatoxines associées à cette matrice complexe sont dégradées mais avec une efficacité inférieure à celle observée quand l'ozonation est réalisée directement sur la solution de standard pure ou sur la poudre de riz (Mc Kenzie *et al*, 1997). Il apparaît que les éléments de la matrice peuvent interférer avec l'efficacité du procédé de décontamination. Ceci a également été constaté au cours d'expériences ayant pour objet l'évaluation de l'efficacité de l'ozone pour l'élimination de populations bactériennes en présence de composés alimentaires (Güzel-Seydim *et al*, 2004). Dans les conditions de ces études, la présence de caséinate de sodium, de gomme ou de crème fouettée induit une nette réduction de l'efficacité de la décontamination par l'ozone.

La modification de certains paramètres tels que l'humidification du grain, le laps de temps entre humidification et traitement Oxygreen®, la concentration en ozone dans le gaz vecteur, ou la pression partielle d'application, permettra d'optimiser le potentiel de dégradation des mycotoxines par ce procédé, ceci est notamment très important dans le cadre de contaminations naturelles.

Les conditions que nous avons appliquées pour le traitement Oxygreen® n'altèrent ni les propriétés technologiques, ni les propriétés nutritives du grain de blé, tout en permettant une nette réduction du taux de contamination.

L'application du procédé Oxygreen® sur le blé devrait permet d'obtenir une farine à fort taux d'extraction, c'est-à-dire des farines de type complet avec un fort pourcentage des parties périphériques du grain, qui conserve ses apports en vitamines tout en étant exempt de contaminants.

Il s'agit maintenant de tester l'innocuité du procédé Oxygreen® d'un point de vue toxicité (cytotoxicité, génotoxicité,...) sur modèles cellulaires et animal. Ceci est l'objet des chapitres 2, 3 et 4.

Chapitre 2 : Evaluation du procédé Oxygreen® : Etude de la toxicité sur modèle cellulaire *in vitro*

L'efficacité du procédé Oxygreen®, pour la décontamination en mycotoxines du blé, ayant été clairement défini, il faut maintenant s'assurer que l'application du procédé Oxygreen®, sur un blé contaminé en mycotoxines, ne conduit pas à la formation de produits néoformés qui pourraient générer une toxicité.

Dans un premier temps, nous avons cherché à voir si nos solutions contaminées en mycotoxines, traitées ou non par l'ozone, étaient cytotoxiques et génotoxiques. C'est l'objet de la première partie des résultats présentés dans ce chapitre 2. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la toxicité d'un extrait obtenu à partir de blé contaminé ou non en mycotoxine, et traité ou non, par le procédé Oxygreen®, ceci afin de s'assurer qu'aucun produit néoformé, généré après action du procédé Oxygreen® sur le blé, n'engendre un effet cytotoxique ou génotoxique sur modèle cellulaire. Les résultats obtenus sont présentés dans la seconde partie de ce chapitre 2. Enfin, au vu des résultats, nous en sommes venu à nous intéresser à une qualité particulière de blé : du blé pré-germé. Les résultats seront présentés en dernière partie de ce chapitre. Nous concluons et discuterons les résultats obtenus concernant l'étude de la toxicité réalisée sur modèle cellulaire.

2.1 Etude du potentiel toxique des solutions de mycotoxines traitées par le procédé Oxygreen® sur modèle cellulaire *in vitro*

2.1.1 Choix des modèles cellulaires

Deux types de lignées cellulaires ont été utilisés ici : (i) les cellules HK-2, lignée de cellules épithéliales rénales humaines (ii) les cellules WI 26, lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines.

La lignée de cellules rénale humaine HK-2 a été établie, en 1994 par Ryan *et al.*, à partir d'un cortex de rein sain d'un homme adulte. Ces cellules sont de type épithélial, non tumorigènes, et possèdent les propriétés caractéristiques des cellules tubulaires proximales. Ces cellules ont été immortalisées par transfection des gènes E6/E7 du papilloma virus 16 humain (HPV-16). Elles ont retenu les caractéristiques fonctionnelles de l'épithélium du tubule proximal telles que les systèmes de transport dépendant du sodium. Elles présentent l'avantage d'être des cellules de rein qui est l'organe cible de l'action toxique de l'OTA et de la CIT (cf revue bibliographique voir paragraphe 2.2.2.2).

La lignée de cellules WI 26 a été établie, par Girardi *et al.*, en 1965, par transformation de cellules bronchiques épithéliales humaines par le virus SV40. Les cellules WI ont déjà été utilisées pour l'étude du mécanisme d'action de l'OTA (El Adlouni *et al.*, 2000 ; Pinelli *et al.*, 1999 ; Molinié, 2005). Elles répondent à une exposition à l'OTA que ce soit d'un point de vue cytotoxique par inhibition/stimulation de la prolifération cellulaire, ou d'un point de vue génotoxique, par la formation d'adduits à l'ADN. Ces cellules sont un bon modèle cellulaire pour l'étude de la toxicité de l'OTA dans la mesure où elles ont les mêmes voies de métabolisation que les cellules rénales. Bien que disposant de cellules rénales, nous avons également travaillé sur ce modèle de cellules car nous disposons de plusieurs études concernant l'étude de la toxicité et de la métabolisation de l'OTA sur ce modèle cellulaire.

2.1.2 Etude de la cytotoxicité

2.1.2.1 Principe général

Certains agents ont une action cytotoxique sur les cellules, c'est-à-dire qu'ils vont induire un ralentissement du métabolisme et une mortalité cellulaire. La viabilité des cellules ou l'indice de mort des cellules peut être étudié afin de déterminer le potentiel cytotoxique de la molécule d'intérêt. Les cellules ont été exposées pendant 24 heures aux solutions contaminées ou non en mycotoxines, et, traitées ou non par l'ozone. La quantité de cellules viables au terme de l'exposition est déterminée en se référant à l'activité métabolique des cellules. Les cellules vivantes et métaboliquement actives vont transformer les sels de tétrazolium, ajoutés dans le milieu de culture au cours du test de cytotoxicité,

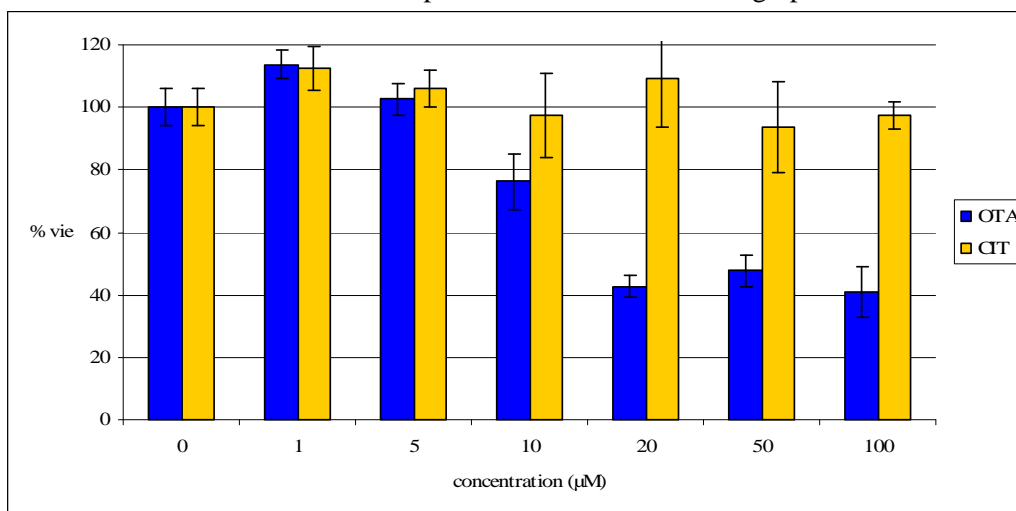
en un produit coloré : le formazan (test au MTT). Ce composé absorbe à une longueur d'onde de 570nm. Ainsi, la mesure de l'absorbance du milieu de culture des cellules à cette longueur d'onde renseigne sur la quantité de formazan formée, laquelle est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes dans le puits de culture. Le témoin cellulaire ne subit aucune exposition. Il nous permet de déterminer la quantité de cellules présentes dans le puits de culture 24 heures après l'ensemencement des puits en conditions normales de croissance. Les résultats, concernant l'inhibition de la croissance cellulaire liée à l'exposition des cellules au composé cytotoxique, sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes par rapport au témoin cellulaire dans lequel nous considérons que 100% des cellules sont vivantes au terme des 24 heures. Le test est décrit de façon plus détaillée au chapitre « matériel et méthode ».

2.1.2.2 Résultats

2.1.2.2.1 Potentiel cytotoxique sur cellules rénales humaines HK-2

2.1.2.2.1.1 Etude de l'exposition des cellules rénales humaines HK-2 à des solutions d'OTA et/ou de CIT

L'inhibition de la prolifération cellulaire a été étudiée sur les cellules HK-2 exposées à diverses concentrations d'OTA et de CIT. L'effet d'une exposition conjointe à ces deux toxines a aussi été étudié. Les concentrations testées sont comprises entre 1 et 100µM de chacune des toxines ; chaque essai a été réalisé en triplicata. Ces concentrations en mycotoxines ont été choisies de façon à être proches de celles retrouvées lors de l'exposition des cellules aux solutions de mycotoxines traitées ou non par l'ozone. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous sur les graphes 7 et 8.



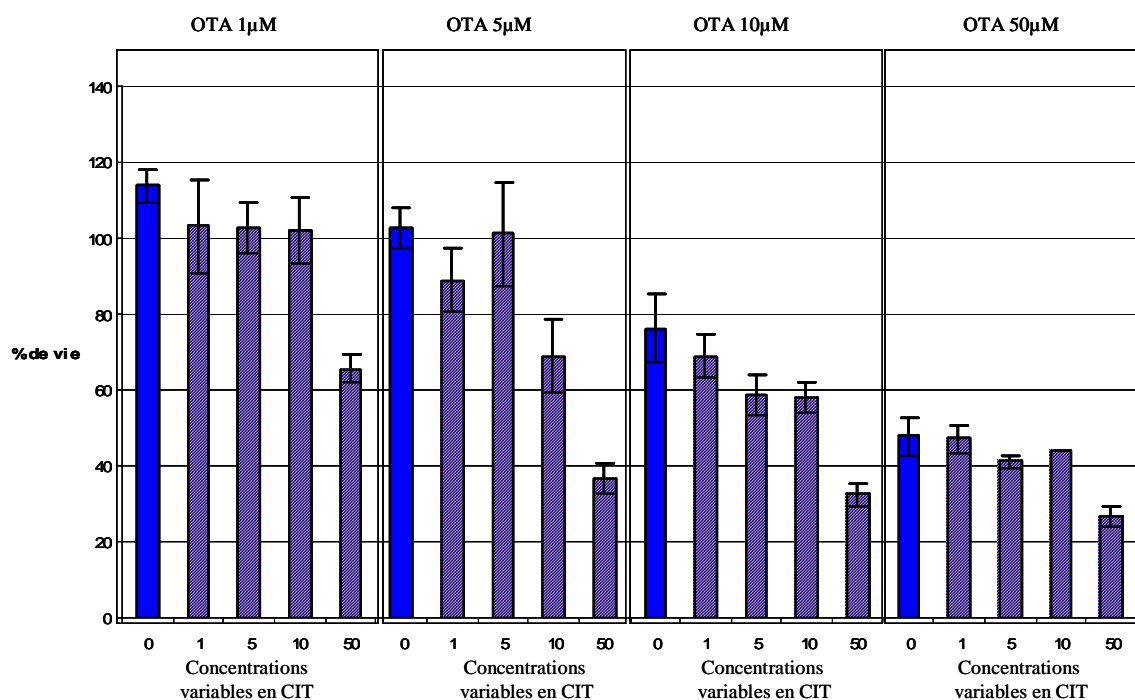
Graph 7. : pourcentage de cellules HK-2 vivantes suite à l'exposition pendant 24 heures à des concentrations croissantes en mycotoxines, comprises entre 0 et 100µM.

Il apparaît que les cellules HK-2 sont sensibles à l'OTA : on observe une inhibition de la prolifération cellulaire d'au minimum 20% quand les cellules sont exposées à des concentrations supérieures ou égales à 10µM d'OTA. Pour des concentrations supérieures ou égales à 20µM d'OTA, l'inhibition de la prolifération cellulaire est plus prononcée ; cependant, même pour les doses les plus élevées testées ici, soit 100µM, la mortalité cellulaire n'excède pas 60%.

Les cellules sont par contre peu sensibles à une exposition à la CIT puisque l'on n'observe pas d'inhibition de la croissance cellulaire, et ce, quelle que soit la dose testée.

Un léger effet proliférateur est observé quand les cellules sont exposées aux doses de 1 µM d'OTA ou de CIT. En effet, on observe une augmentation de 12% en moyenne, par rapport au témoin non exposé, de la quantité de cellules dans les conditions d'exposition à 1µM de toxine.

L'effet d'une exposition conjointe à l'OTA et à la CIT a également été étudié. Les résultats sont présentés sur le graphique 8.



À l'intérieur d'un même cadre, la dose d'exposition des cellules à l'OTA est fixe, et la quantité de CIT ajoutée dans le milieu de culture est précisée sur l'axe des abscisses.

Graph 8. : effet de l'exposition pendant 24 heures des cellules HK-2 à un mélange des deux toxines, OTA et CIT, sur le pourcentage de cellules vivantes par rapport à un témoin non exposé.

Les cellules sont exposées à une dose fixe d'OTA (1, 5, 10 ou 50 µM en fonction des différents cadres) à laquelle est ajoutée une dose variable de CIT, précisée sur l'axe des abscisses et comprise entre 1 et 50 µM. Nous avons précédemment montré que ces doses de CIT, comprises entre 1 et 50 µM, ne génèrent aucune mortalité sur ces cellules HK-2. C'est pourquoi l'effet combiné de ces deux mycotoxines est comparé à l'effet de l'exposition à l'OTA seule.

Il apparaît que l'addition de 50 µM de CIT dans le milieu de culture contenant 1 µM d'OTA, entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire d'environ 40%. Comme les doses de 1 µM d'OTA, ou de 50 µM de CIT ne sont, à elles seules, pas cytotoxiques, il est intéressant de noter que la combinaison de ces deux doses de toxines dans le milieu cellulaire aboutit à l'apparition d'une cytotoxicité. De même, la dose de 5 µM d'OTA est non cytotoxique ; l'addition dans le milieu de culture contenant 5 µM d'OTA de 10 ou 50 µM de CIT entraîne l'apparition d'une cytotoxicité avec une inhibition de la croissance cellulaire comprise entre 30 et 60%. Cette augmentation de la cytotoxicité suite à l'exposition conjointe des cellules à ces deux mycotoxines est également observée quand le milieu est contaminé à 10 et 50 µM d'OTA. Il existe donc un effet synergique de ces deux mycotoxines puisque l'application en combinaison de deux doses de toxines, non cytotoxiques seules, génère une inhibition de la croissance cellulaire.

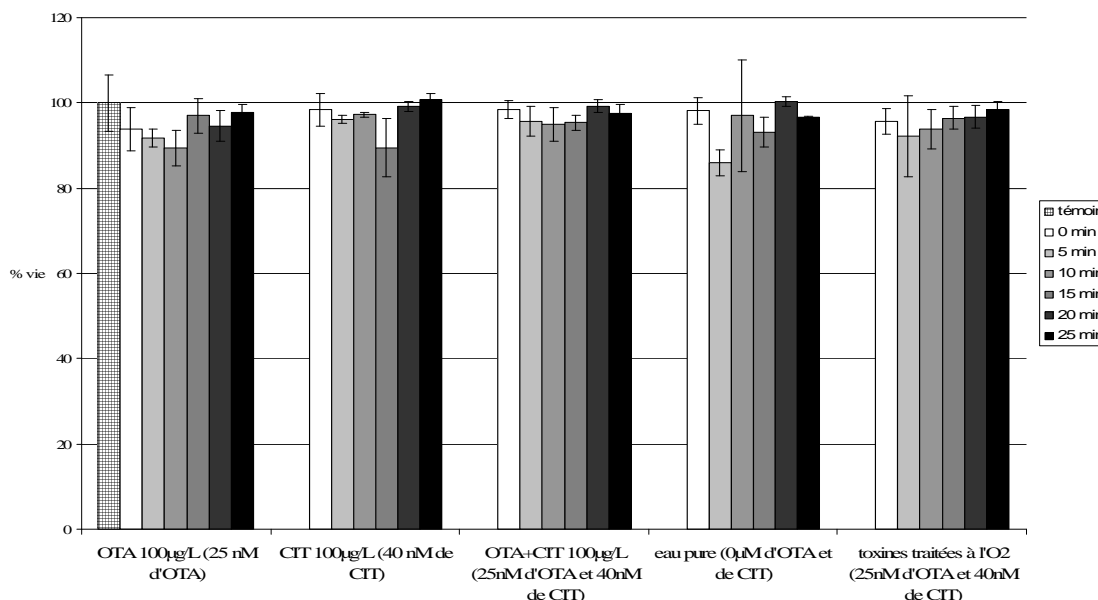
Comme ces cellules sont sensibles à une exposition à l'OTA et à la citrinine, elles seront un bon modèle pour l'étude de la cytotoxicité induite par les solutions traitées par l'ozone.

2.1.2.2.1.2 Exposition des cellules rénales humaines HK-2 aux solutions contaminées ou non en mycotoxines, et traitées ou non par l'ozone

Nous disposons des solutions contaminées en OTA, en CIT ou en une combinaison des deux toxines, et traitées par l'ozone des durées comprises entre 0 et 20 minutes. Nous avons testé les solutions les plus concentrées initialement en mycotoxines, soit la solution contaminée initialement à 100 µg/litre d'OTA et/ou de CIT. L'exposition des cellules, résultant de l'addition de 10 µl de cette solution contaminée en mycotoxines dans le puits de culture des cellules, équivaut à une exposition à 25 nM d'OTA et à 40 nM de CIT environ. Bien que les concentrations en mycotoxines dans le puits de culture des cellules soient très faibles (25 nM d'OTA et 40 nM de CIT), nous en avons tout de même

testé le potentiel cytotoxique afin de visualiser si d'éventuels produits néoformés induisent une cytotoxicité supérieure à celle des mycotoxines. Ceci a été comparé à une solution d'eau pure, traitée à l'ozone, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le traitement des solutions de mycotoxines, ainsi qu'à celle d'une solution de mycotoxines traitées par un flux d'oxygène.

Les résultats sont présentés ci-après sur le graphe 9. La concentration en mycotoxines de la solution testée avant son ozonation est rappelée sous l'axe des abscisses et la concentration à laquelle sont exposées les cellules, lors de l'exposition à la solution non ozonée, est précisée entre parenthèses.



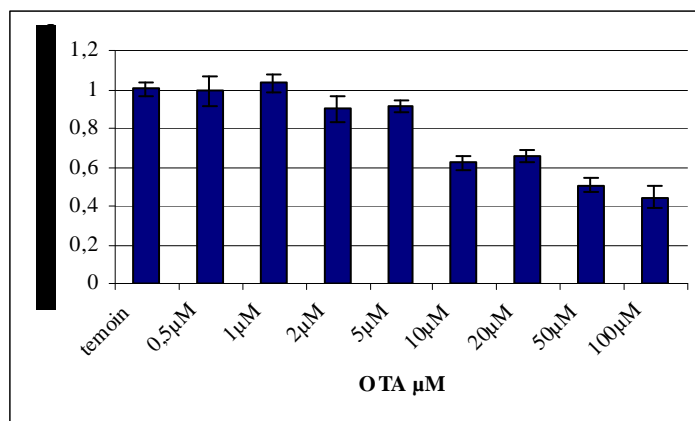
Graphe 9. : Pourcentage de survie, par rapport au témoin cellulaire non exposé, des cellules HK-2 exposées aux différentes solutions de mycotoxines, contaminées à 100µg/L, ou à de l'eau pure, ozonées pendant 0, 5, 10, 15 et 20 minutes.

Le pourcentage de survie des cellules HK-2 est supérieur à 90%, quelle que soit la contamination ou la durée d'ozonation de la solution testée. Les solutions contaminées en OTA, en CIT ou, en OTA et CIT à 100µg/l (0 minutes d'ozonation) ne génèrent aucune toxicité, ce qui est en accord avec les résultats observés précédemment. L'ozonation de ces solutions n'entraîne pas l'apparition de cytotoxicité. Ces résultats obtenus avec les cellules HK-2 indiquent que l'ozone ne conduit pas à la formation de produits, dérivés des mycotoxines, plus toxiques que l'OTA ou CIT sur ce modèle cellulaire. Une survie comparable des cellules est observée quand celles-ci sont exposées à une eau pure ozonée ou à une eau contaminée en OTA et CIT et soumise à un flux d'oxygène. La différence de survie d'environ 10% par rapport au témoin, observée dans toutes les conditions d'exposition, résulte de l'addition de l'eau dans le milieu de culture des cellules (10% en volume).

2.1.2.2.2 Etude du potentiel cytotoxique sur modèle cellulaire bronchique humain WI 26

2.1.2.2.2.1 Exposition des cellules bronchiques humaines WI 26 à des solutions d'OTA et/ou de CIT

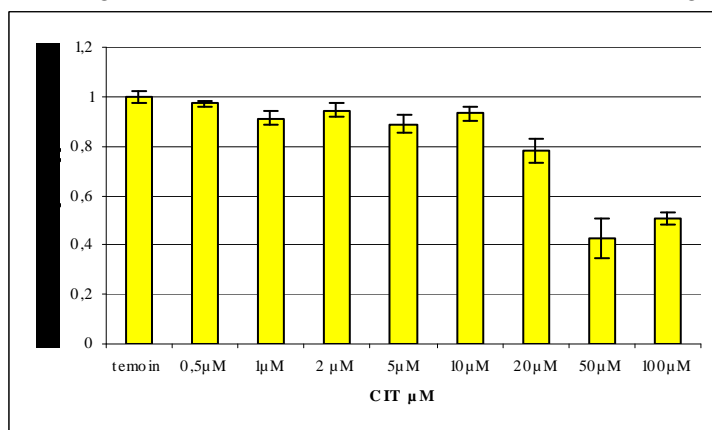
Les cellules WI répondent à une exposition à l'OTA et à la CIT comme démontré dans le travail de thèse de Anne Molinié, 2004. Les résultats obtenus par Anne Molinié et tirés de sa thèse sont rappelés ci-après.



Graph 10. : Viabilité des cellules bronchiques WI exposées pendant 24 heures à diverses concentrations en OTA. Source : Thèse A. Molinié (2004).

On observe 20% d'inhibition de la croissance cellulaire pour des concentrations comprises entre 2 et 5 μM d'OTA et plus de 40% d'inhibition de la prolifération pour les concentrations supérieures ou égales à 10 μM . La concentration en OTA pour laquelle on enregistre 50% de mortalité cellulaire a été établie à 50 μM . Un léger effet proliférateur est également observé sur ce modèle cellulaire pour une exposition à une concentration de 1 μM de toxine.

Les cellules WI sont également sensibles à la CIT comme montré sur le graph 11.



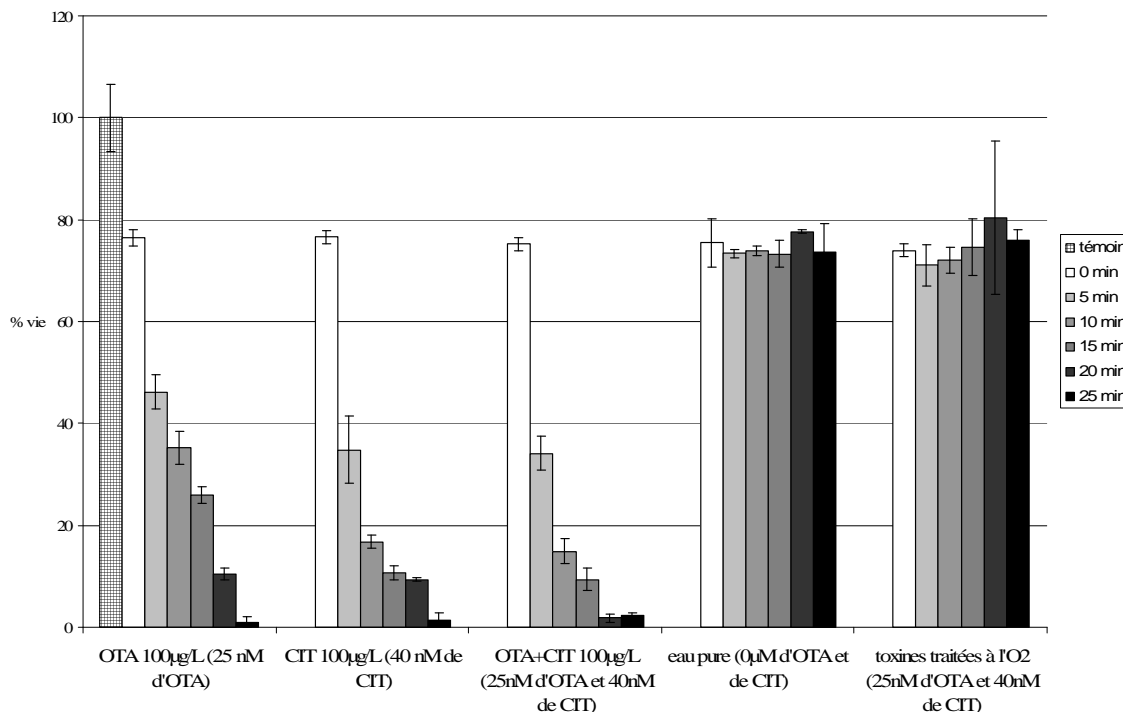
Graph 11. : viabilité des cellules bronchiques humaines WI exposées 24 heures à diverses concentrations en CIT. D'après la thèse d'A. Molinié (2004).

Ainsi, l'exposition des cellules à une concentration en CIT de 20 μM résulte en une inhibition de 20% de la prolifération cellulaire ; des concentrations supérieures ou égales à 50 μM induisent une inhibition de la prolifération cellulaire supérieure à 50%. De plus, l'exposition des cellules à une combinaison de ces deux toxines peut avoir tantôt un effet synergique, tantôt un effet antagoniste sur la prolifération cellulaire, et ce en fonction de la concentration relative des toxines, l'une par rapport à l'autre (Molinié, 2004).

2.1.2.2.2 Exposition des cellules bronchiques humaines WI 26 aux solutions contaminées ou non en mycotoxines et traitées ou non par l'ozone

Les puits de la plaque de prolifération ont étéensemencés avec 5000 cellules dans un volume de 90 μl . L'exposition des cellules a été réalisée comme décrit pour les cellules HK-2, c'est-à-dire par addition de 10 μl de la solution à tester dans le milieu de culture, pendant 24 heures. De même que pour les cellules HK-2, un témoin cellulaire est réalisé. Les solutions testées sont les solutions contaminées en OTA ou en CIT et traitées à l'ozone 0, 5, 10, 15 ou 20 minutes, une solution d'eau

pure ozonée 0, 5, 10, 15 ou 20 minutes et enfin, une solution de mycotoxines traversées par un flux d'oxygène pendant les mêmes durées. Les résultats obtenus sont présentés sur le graphe 12. La concentration en mycotoxines de la solution testée avant son ozonation est rappelée sous l'axe des abscisses et la concentration à laquelle sont exposées les cellules, lors de l'exposition à la solution non ozonée, est précisée entre parenthèses.



Graph 12. : Pourcentage de survie, par rapport au témoin cellulaire non exposé, des cellules WI 26 exposées aux différentes solutions de mycotoxines, contaminées à 100µg/l, ou à de l'eau pure, ozonées pendant 0, 5, 10, 15 et 20 minutes.

Quand les cellules sont exposées aux solutions de mycotoxines non ozonées, ce qui correspond à l'histogramme « zéro » minutes d'ozonation sur le graphe, nous observons une réduction de la viabilité cellulaire de 20% environ. Cette inhibition de la prolifération cellulaire est observée que les cellules soient exposées à de l'eau pure ou qu'elles soient exposées aux solutions contaminées en mycotoxines. Cette inhibition peut donc être attribuée à l'addition d'eau dans le milieu de culture. Nous n'observons pas de mort cellulaire quand les cellules sont exposées à la solution de mycotoxines non ozonées (histogramme blanc, zéro minutes d'ozonation). Les doses d'exposition de 25nM pour l'OTA, et de 40nM pour la CIT, sont des doses faibles, inférieures à celles entraînant une réduction de la viabilité (cf graphes 10 et 11). De même, aucune cytotoxicité n'est observée quand les cellules sont exposées à une combinaison de ces deux mycotoxines.

Nous observons par contre une diminution très nette de la viabilité cellulaire quand les cellules WI sont exposées à des solutions de mycotoxines traitées pendant des durées variables par l'ozone. En effet, les cellules exposées à une solution de mycotoxines ozonée 5 minutes, ont une viabilité réduite de 40 à 55% par rapport à la viabilité observée quand les cellules sont exposées à la même solution de mycotoxines non ozonée. Cette diminution de la viabilité cellulaire est observée que les cellules soient exposées à une solution de CIT, d'OTA, ou d'OTA et de CIT ozonée. Cependant, la réduction de la viabilité des cellules après exposition à une solution ozonée est légèrement plus prononcée quand il s'agit de l'exposition à une solution de CIT ou à une combinaison de CIT et d'OTA que lors d'une exposition à l'OTA seule. Ainsi, on observe 40% d'inhibition de la viabilité cellulaire quand les cellules sont exposées à une solution d'OTA ozonée 5 minutes. Quand les cellules sont exposées à une solution de CIT, ou, de CIT et d'OTA, ozonée 5 minutes, on visualise respectivement 55 et 54% d'inhibition de la prolifération cellulaire par rapport à l'exposition à la solution non ozonée. Ceci est

également observé quand les cellules sont exposées aux solutions ozonées plus longtemps : pour l'exposition à une solution ozonée 10 minutes, la réduction de la prolifération cellulaire est de 54% pour la solution d'OTA et de 78% pour la solution de CIT.

Il semble donc, que le profil d'inhibition de la croissance cellulaire soit dépendant du type de mycotoxine présent dans la solution : l'application de l'ozone sur une solution de CIT conduit à un effet cytotoxique sur les cellules WI 26, supérieur à celui observé lors de l'exposition à une solution d'OTA ozonée. La cytotoxicité augmente de façon linéaire en relation avec la durée d'ozonation des solutions utilisées pour l'exposition. Nous avons émis l'hypothèse que la concentration en ozone dans l'eau augmentait en fonction de la durée du traitement et que cette solubilisation de l'ozone dans la phase aqueuse pourrait être responsable de l'effet cytotoxique observé lors de l'exposition des cellules WI 26 à ces solutions ozonées. Cette hypothèse n'est pas confirmée puisque nous n'observons pas de mortalité cellulaire quand les cellules sont exposées à de l'eau pure ozonée.

D'autre part, nous avons noté une acidification de la solution de mycotoxines au cours du procédé d'ozonation, laquelle pourrait être à l'origine de cette inhibition de la prolifération cellulaire. Cette acidification ne peut pas à elle seule expliquer le potentiel cytotoxique des solutions ozonées puisque le pH de la solution contaminée en OTA est inférieur ou égal à celui de la solution contaminée en CIT. De plus, après 10 minutes d'ozonation, le pH de la solution se stabilise alors que le potentiel cytotoxique de la solution continue à augmenter.

2.1.3. Etude du potentiel génotoxique des solutions ozonées

2.1.3.1 Principe général

La méthode utilisée pour l'étude de la génotoxicité est la méthode de détection des adduits à l'ADN, décrite de façon plus détaillée au chapitre « Matériel et Méthode ».

Après ingestion d'un xénobiotique, celui-ci sera distribué au niveau des organes où il pourra être métabolisé. Ce xénobiotique ou un de ses métabolites pourra former une liaison covalente avec la molécule d'ADN par l'intermédiaire d'une réaction de type électrophile/nucléophile, entraînant la formation d'un complexe appelé adduit (pour **addition de produits**) à l'ADN. Cette lésion primaire de l'ADN est une étape importante dans les phénomènes d'initiation des cancers (Miller & Miller, 1981). Les adduits à l'ADN peuvent naître par action directe d'un xénobiotique génotoxique, cependant, la plupart des xénobiotiques ne sont actifs qu'après leur métabolisation *in vivo* en dérivés électrophiles susceptibles de se lier aux acides nucléiques (Miller & Miller, 1981).

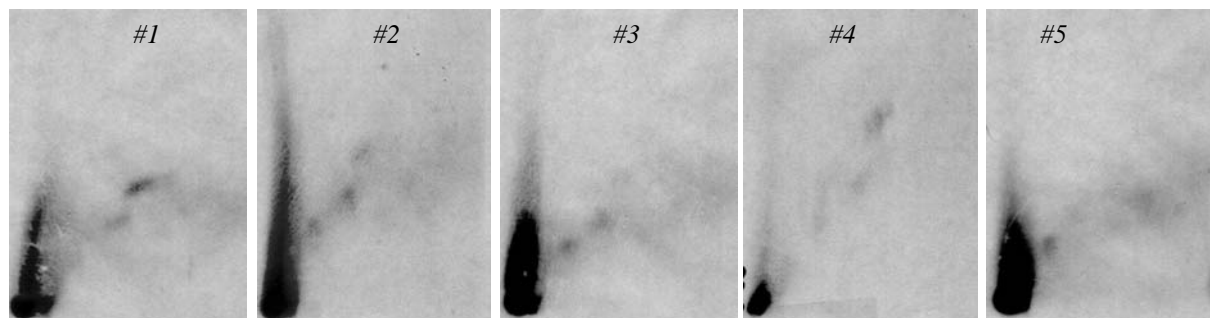
La méthode du post-marquage au ^{32}P présente une sensibilité élevée puisqu'elle permet la détection d'un adduit par 10^{10} nucléotides. En outre, elle ne requiert l'utilisation que de quelques microgrammes d'ADN et ne nécessite pas de connaître la structure chimique des adduits recherchés.

Les cellules bronchiques WI 26 ayant montré une très forte sensibilité aux différentes solutions de mycotoxines traitées par l'ozone, nous avons cherché à savoir si nous observions dans celles-ci la formation d'adduits à l'ADN.

2.1.3.2 Résultats

Les cellules ont été exposées, pendant 24 heures, aux différentes solutions de mycotoxines, traitées ou non par l'ozone : 100 µl des solutions, obtenues après 0, 5, 10 et 15 minutes d'ozonation, sont ajoutés à 10 ml de milieu de culture des cellules. La concentration testée pour l'étude de la génotoxicité est inférieure d'un facteur 10 à celle utilisée en cytotoxicité. Celle-ci doit nous permettre de récupérer une quantité suffisante de cellules afin de pouvoir en extraire l'ADN, et de visualiser les effets génotoxiques s'ils existent.

Au terme de l'exposition, le tapis cellulaire est retiré de la flasque et l'ADN des cellules est extrait et purifié. Le marquage radioactif des adduits est réalisé sur 4 µg d'ADN de cellules bronchiques WI. Les autoradiogrammes obtenus après marquage de l'ADN des cellules exposées aux solutions d'OTA (100 µg/l) traitées 0, 5, 10 et 15 minutes à l'ozone sont présentés ci-après (Autoradiogrammes 1 à 5).



Autoradiogrammes 1, 2, 3, 4, 5: Autoradiogrammes obtenus après le marquage de l'ADN des cellules WI 26 exposées à une solution d'OTA contaminée à 100µg/l, traitée à l'ozone pendant 0 (#1), 5 (#2), 10 (#3), 15 (#4) minutes à l'ozone ou non exposées (témoin, #5).

Des adduits sont observés sur chacun des autoradiogrammes obtenus suite à l'exposition des films pendant 72 heures au congélateur à -80°C. Cependant, leur intensité est très faible, en dessous du seuil de quantification du bioimager. Par ailleurs, un des deux adduits visualisé est également présent sur l'autoradiogramme correspondant au marquage de l'ADN des cellules non exposées (#5). Aucun de ces deux adduits n'est présent sur le chromatogramme #4, correspondant au marquage de l'ADN des cellules exposées à la solution d'OTA ozonée pendant 15 minutes. Des résultats similaires ont été obtenus quand les cellules sont exposées aux solutions de CIT (25 et 100µg/l) ou à la solution d'OTA (25µg/l) traitées par l'ozone. Ainsi, nous n'avons pas visualisé la formation d'adduits à l'ADN des cellules en quantité significative, en relation avec le traitement à l'ozone des solutions contaminées en mycotoxines utilisées pour réaliser l'exposition.

2.1.4 Conclusion et discussion de l'étude *in vitro* du potentiel toxique des solutions de mycotoxines ozonées

Les cellules rénales HK-2, tout comme les cellules pulmonaires WI 26, sont sensibles à l'exposition à une solution d'OTA. L'effet cytotoxique lié à l'exposition des cellules rénales HK-2 à une solution de CIT n'est quasiment pas observable aux concentrations testées (entre 1 et 100µM de CIT). Par contre, un effet cytotoxique synergique de ces deux mycotoxines a pu être mis en évidence sur ce modèle cellulaire rénal, celui-ci étant comparable à celui observé sur les cellules WI 26 (Molinié, 2004). Cet effet synergique a déjà été observé *in vivo*, puisque chez la souris, l'exposition à une combinaison de ces deux mycotoxines conduit à une augmentation des carcinomes rénaux (Sansing *et al*, 1976 ; Kanisawa, 1984b). Les effets synergiques de ces deux mycotoxines, retrouvées associées dans des régions où sévit la BEN (Vrabcheva *et al*, 2000), sont à prendre en compte pour expliquer la survenue de cette néphropathie.

Les essais de cytotoxicité menés avec ces solutions de mycotoxines, contaminées en OTA et/ou en CIT, et ozonées pendant des durées variables, sur le modèle cellulaire rénal HK-2, montrent qu'aucun composé cytotoxique vis-à-vis de ce modèle cellulaire n'est généré. Par contre, l'analyse de la cytotoxicité sur le modèle cellulaire WI 26 révèle que l'ozonation appliquée sur les solutions contaminées en mycotoxines génère des modifications de cette solution qui engendrent une cytotoxicité. Par ailleurs, la cytotoxicité générée suite à l'exposition des cellules à une solution de mycotoxines ozonées est légèrement plus importante quand il s'agit d'une solution de CIT. L'ozone dégrade très rapidement ces toxines en solution (chapitre 1.2.2) en composés non détectés par UVs, fluorimétrie et spectrométrie de masse dans les conditions permettant la détection de l'OTA. Néanmoins, un effet cytotoxique est observé sur ce modèle. L'apparition de cette toxicité n'est pas directement dépendante de la nature de la mycotoxine traitée ; la différence de cytotoxicité observée entre une exposition à une solution d'OTA ozonée et à une solution de CIT peut venir du fait que la CIT est dégradée plus rapidement que l'OTA en éléments simples, lesquels réagiront avec l'ozone pour former des composés cytotoxiques. Néanmoins, les produits simples de dégradation de ces mycotoxines vont être différents avec formation d'HCl, HNO₃ et CO₂ dans le cas de l'OTA, et de CO₂ dans le cas de la CIT. Cette dégradation des mycotoxines en éléments simples (tels que CO₂, HCl, HNO₃) peut être soutenue par l'observation de la diminution du pH dans les solutions ozonées.

Enfin, l'ozone peut se décomposer en solution aqueuse en conduisant à la formation d'espèces réactives. Plusieurs travaux ont montré que la décomposition de l'ozone résultait d'une réaction en chaîne dans laquelle l'ion hydroxyle joue un rôle majeur (cf revue bibliographique, chapitre 4.2.2.1). Les espèces radicalaires formées au cours de la réaction initient la réaction en cascade. L'ozone peut ainsi soit réagir avec son substrat soit, au-delà d'un pH critique, se décomposer. La stabilité de l'ozone dissoute en phase aqueuse va fortement dépendre du pH mais également d'autres facteurs tels que la concentration en ozone dans la solution mais aussi de la présence de facteurs initiateurs, propagateurs ou inhibiteurs de radicaux libres en solution. Ainsi les conditions de pH acides trouvées dans les solutions de mycotoxines vont conduire à la décomposition de l'ozone ; ceci aura pour effet une baisse du pH due à la disparition des ions OH^- et à la génération d'espèces radicalaires réactives qui pourront être à l'origine de la cytotoxicité observée. Ces espèces radicalaires pourront exercer une action toxique directe, ou éventuellement attaquer les mycotoxines présentes en solution, les rendant à leur tour réactives. Lors de l'ozonation de la solution de CIT, le substrat est rapidement éliminé de la solution, et la décomposition de l'ozone dans la phase aqueuse acidifiée peut avoir lieu plus intensément et plus précocement par rapport à ce observé lors de l'ozonation de la solution d'OTA.

Les différents types cellulaires utilisés disposent de voies de métabolisation et de détoxification différentes ce qui peut expliquer les différences observées concernant leur sensibilité aux solutions de mycotoxines ozonées d'un point de vue cytotoxicité. Les cellules HK-2, d'origine rénale, concentrent les mécanismes de détoxification notamment les catalases, SOD et peroxydases. La présence de ces enzymes au niveau rénal peut expliquer la résistance des cellules HK-2 aux effets cytotoxiques des solutions de mycotoxines ozonées. D'autre part, le modèle bronchique WI 26 sur-exprime le gène codant pour la protéine p53. Cette protéine intervient dans la régulation de l'entrée en mitose, et joue donc un rôle dans la prolifération cellulaire. L'induction de ce gène conduira par conséquent à des effets inhibiteurs de la prolifération cellulaire plus prononcés que ceux observés sur un modèle cellulaire ne sur-exprimant pas le gène.

Il est à noter que, bien que l'on ait apparition d'une cytotoxicité sur les cellules bronchiques WI 26 exposées aux solutions ozonées, on ne visualise aucune génotoxicité.

2.2 Etude du potentiel toxique d'extraits de blé obtenus à partir des blés contaminés en OTA et traités ou non par Oxygreen® sur modèle cellulaire bronchique

Nous avons recherché si le procédé Oxygreen® appliqué sur le grain de blé contaminé en OTA modifiait, ou non, la toxicité globale. Les interactions existant entre la matrice et la toxine vont pouvoir influencer, de façon positive ou négative, la génération de composés toxiques après ozonation. L'étude a été réalisée sur l'OTA, mycotoxine dont le taux de contamination est régi par la législation Européenne CE N° 123/2005, et dont le contrôle dans les céréales est prioritaire.

2.2.1 Constitution des extraits de blé

Ces extraits de blé ont été constitués en suivant le protocole d'extraction de l'OTA sur le blé, et ce, afin de recueillir tous les éventuels métabolites de l'OTA. Aucun métabolite de l'OTA n'a certes été détecté lors du traitement par l'ozone des solutions aqueuses de mycotoxines ; cependant, les conditions d'ozonation utilisées sur le blé étant moins drastiques que celles utilisées en phase aqueuse et celles-ci ne diminuant le taux d'OTA que de 70% au maximum, nous pouvons envisager que des métabolites de l'OTA soient générés comme intermédiaires de dégradation de l'OTA par l'ozone.

Pour l'obtention des extraits, le blé a été finement broyé puis nous avons réalisé une extraction de type liquide/liquide. La première étape d'extraction est conduite en conditions acides. L'acidification et la force ionique de la solution d'extraction, permettent de rompre en partie les liaisons des toxines aux constituants de la matrice et favorisent ainsi leur extraction par un solvant de type hydrophobe comme l'acétonitrile. Lors de cette extraction, une multitude de composés du blé ayant des propriétés physico-chimiques comparables à celles de l'OTA (hydrophobicité, pKa..) sont également récupérées. Ces extraits contiennent par conséquent non seulement l'OTA mais également, ses dérivés ainsi que divers composés du blé.

Des extraits de blé ont été réalisés à partir des blés OXBM 01.201 et OXBM 01.202, non artificiellement contaminés en OTA. Cependant, nous avons vu que ces lots de blé contenaient une faible quantité d'OTA d'origine naturelle: ces lots de blé ne peuvent pas être considérés comme des lots de blé témoins à proprement parler. Nous avons donc introduit, dans nos expériences *in vitro*, un lot de blé « externe » dépourvu de contamination en mycotoxine. Nous avons également réalisé des extraits de blé à partir des lots de blé artificiellement contaminés en OTA et traités, ou non, par le procédé Oxygreen®. Tous ces extraits ont été utilisés pour évaluer le potentiel cytotoxique et génotoxique des extraits de blé traités ou non par le procédé Oxygreen®, sur modèle cellulaire pulmonaire épithélial humain. Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

2.2.2 Potentiel cytotoxique des différents lots de blé, traités ou non par Oxygreen®

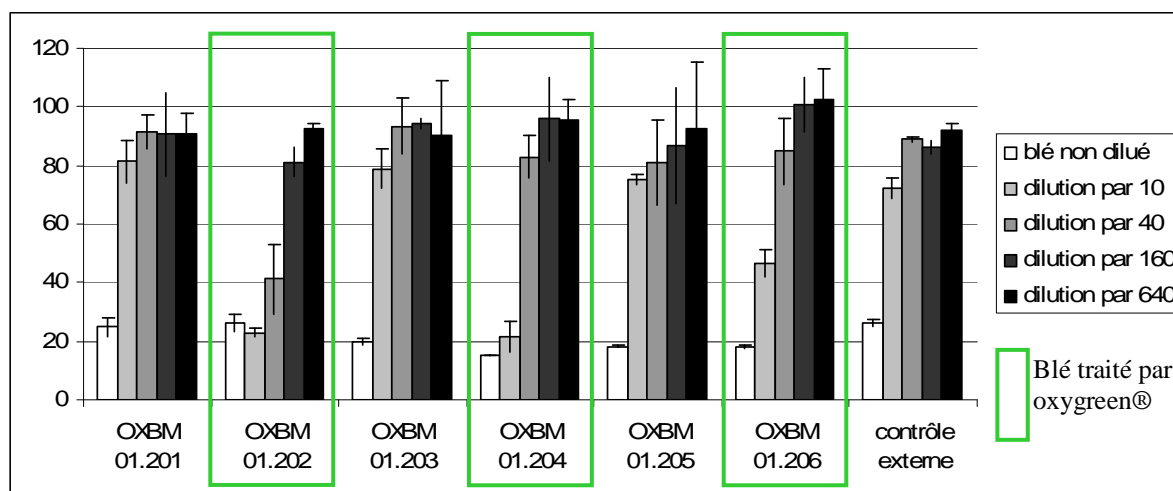
Les cellules pulmonaires humaines ont été exposées, pendant 24 heures, à diverses concentrations en extrait de blé. Pour chaque extrait de blé, 5 dilutions de l'extrait sont testées et chaque test est réalisé en triple. Chaque exposition est effectuée par dépôt dans le puits de 10µl de la dilution de l'extrait de blé à tester. On réalise une exposition avec l'extrait de blé non dilué, puis des expositions avec des dilutions au dixième, quarantième, cent quarantième et six cent quarantième de l'extrait de départ.

Dans le cas de l'exposition des cellules à un extrait de blé non dilué, les cellules sont mises en contact avec des concentrations en produits extraits du blé de 850 mg d'extrait de blé par ml de milieu de culture. Les concentrations en OTA dans le milieu de culture des cellules exposées aux différents extraits de blé non dilués sont présentées ci-dessous dans le tableau 12.

Exposition des cellules à l'extrait :	OTA en µM dans le milieu de culture
OXBM01.201	1,05
OXBM01.202	0,57
OXBM01.203	202
OXBM01.204	92
OXBM01.205	78
OXBM01.206	23,2
OXBM01.207	13,7
OXBM01.208	3,1

tableau 12. : concentration en OTA dans le milieu de culture des cellules exposées aux divers extraits de blé non dilués, traités par le procédé Oxygreen® (cadre et fond verts), ou non traités par le procédé (cadre et police noirs).

La viabilité des cellules exposées à ces extraits de blé, ainsi qu'à leurs dilutions, a été déterminée en se référant à l'activité métabolique des cellules comme décrit dans le paragraphe 2.1.2.1. Les résultats obtenus sont présentés sur le graphe 13.



Graph 13. : Pourcentage de cellules vivantes après exposition des cellules pendant 24 heures aux différents extraits de blés, ainsi qu'à leurs dilutions, blés artificiellement ou naturellement contaminés en OTA et traités ou non par le procédé Oxygreen®.

Quand les cellules sont exposées à un extrait de blé non dilué (histogramme blanc), la prolifération cellulaire est très fortement inhibée de 80% que les extraits de blé testés soient, ou non, traités par le procédé Oxygreen®. L'inhibition de la prolifération cellulaire, suite à l'exposition des cellules à ces extraits de blé non dilués, est plus forte quand le blé est contaminé en OTA. On observe respectivement 24, 26 et 26% de survie en moyenne quand les cellules sont exposées aux extraits OXBM 01.201, OXBM 01.202 et au contrôle externe alors qu'il est respectivement de 19, 15, 18 et 18% quand les cellules sont exposées aux extraits de blé OXBM 01.203, OXBM 01.204, OXBM 01.205 et OXBM 01.206, artificiellement contaminés en OTA. Cependant, la présence d'OTA ne joue qu'un rôle mineur dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. En effet, une forte inhibition de la prolifération cellulaire est observée quand les cellules sont exposées à l'extrait de blé « contrôle externe » non dilué.

L'OTA induit une inhibition, supérieure à 40%, de la prolifération cellulaire sur ce modèle cellulaire uniquement pour des concentrations supérieures ou égales à 10µM (cf graphique chapitre 2.1.2.2.2). La concentration maximale de 202µM en OTA dans le puits est atteinte lors de l'exposition des cellules à l'extrait de blé OXBM 01.203 non dilué. L'OTA seule, à cette concentration est responsable de 60% de l'inhibition cellulaire sur ce modèle cellulaire ; l'inhibition de la prolifération cellulaire est plus prononcée quand les cellules sont exposées à l'extrait de blé OXBM 01.203 contenant une quantité équivalente d'OTA (80% d'inhibition), ceci confirmant l'implication du blé dans l'apparition de cet effet cytotoxique. Pour l'exposition aux autres extraits de blé non dilués et contaminés en OTA, les concentrations en OTA sont comprises entre 0,5 et 92µM. Ces concentrations en OTA sont responsables d'une inhibition de la prolifération cellulaire de 40% au maximum. L'inhibition de la prolifération cellulaire, observée suite à l'exposition des cellules à ces extraits de blé non dilués, est comprise entre 70 et 80%. Il apparaît donc qu'une grande part de la cytotoxicité est liée à l'addition de l'extrait de blé dans le milieu de culture des cellules, ceci de façon indépendante de la présence d'OTA ou de l'application du traitement Oxygreen®. Ceci est par ailleurs confirmé par les résultats obtenus avec l'exposition des cellules au blé « contrôle externe », pour lequel on observe également un effet cytotoxique avec une réduction de la viabilité de 75%.

La dilution des extraits de blé utilisés pour l'exposition des cellules permet de réduire la mortalité cellulaire. Quand les cellules sont exposées aux extraits de blé OXBM 01.201, OXBM 01.203, OXBM 01.205 et « contrôle externe », non traités par le procédé Oxygreen®, dilués d'un facteur 10, on observe près de 80% de viabilité des cellules. Par contre, la dilution d'un facteur 10 des extraits de blé ozonés ne permet pas de réduire aussi nettement la mortalité des cellules exposées. Un facteur de dilution de 40 est nécessaire pour que la viabilité des cellules exposées aux extraits OXBM 01.206, et OXBM 01.204 atteigne 80%. Une dilution encore supérieure est nécessaire en ce qui

concerne l'extrait de blé OXBM 01.202, confirmant que cette inhibition est sans relation avec la dose d'OTA.

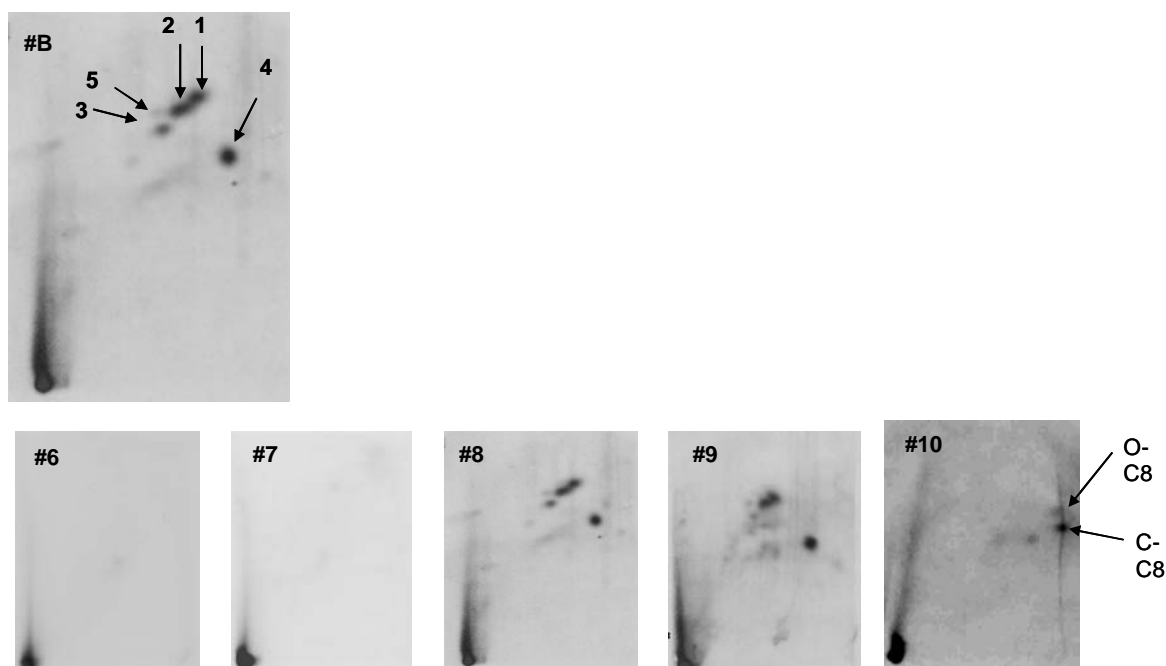
Ainsi, il apparaît que les cellules pulmonaires sont sensibles à une exposition à un extrait de blé quand celui-ci est concentré. L'inhibition de la prolifération cellulaire liée à la présence de blé non ozoné dans le milieu de culture est abolie par une dilution d'un facteur 10 de l'extrait. Il apparaît que le traitement du blé, par le procédé Oxygreen® amplifie la cytotoxicité de l'extrait obtenu, sur ce modèle cellulaire. Cette apparition de la cytotoxicité est indépendante de la présence d'OTA : l'extrait de blé OXBM 01.202, très faiblement contaminé en OTA et traité par Oxygreen®, a un potentiel cytotoxique supérieur à celui des extraits OXBM 01.204 ou OXBM 01.206, lots de blés contaminés à des taux plus importants en OTA et également traités par le procédé Oxygreen®. Comme l'incidence du niveau de contamination en OTA du blé sur le potentiel cytotoxique est très modérée, voire inexistante, l'augmentation du potentiel cytotoxique observée quand les cellules sont exposées à l'extrait de blé ozoné doit résulter de l'amplification du potentiel cytotoxique de la matrice suite à l'application du procédé Oxygreen® sur celle-ci.

2.2.3 Potentiel génotoxique des différents lots de blé

Les cellules bronchiques humaines ont été exposées pendant 24 heures à des concentrations non cytotoxiques des différents extraits de blé. La concentration d'extrait choisie pour l'exposition correspond à l'extrait provenant de 2 grammes de blé par millilitre de milieu de culture. Cette condition de concentration équivaut à celle réalisée avec l'extrait de blé dilué d'un facteur 40. Notre choix s'est porté sur cette concentration car celle-ci nous permet d'avoir une viabilité cellulaire supérieure à 45% quelque soit le type d'extrait utilisé pour réaliser l'exposition mais, par ailleurs, cette condition nous permet d'observer des effets variables sur la prolifération cellulaire de façon dépendante de l'application du traitement Oxygreen® sur le blé utilisé pour réaliser l'exposition. Dans ces conditions d'exposition, les concentrations en OTA dans le milieu de culture des cellules sont comprises entre 12,5 nM (exposition à l'extrait OXBM 01.202) et 5µM (exposition à l'extrait OXBM 01.203). En parallèle, les cellules bronchiques ont été exposées à deux concentrations en OTA : 0,5 et 2,5 µM. Le potentiel génotoxique des solutions d'OTA ou des extraits de blé a été déterminé par la recherche de la formation d'adduits à l'ADN des cellules exposées, comme décrit précédemment.

2.2.3.1 Potentiel génotoxique de solutions pures d'OTA sur les cellules bronchiques

Les autoradiogrammes obtenus suite à l'exposition des cellules à l'OTA, ou à un extrait de blé contrôle externe, sont présentés ci-après (Autoradiogrammes 6, 7, 8, 9). Les adduits ont été quantifiés et leur nombre est exprimé en nombre d'adduits/10⁸ nucléotides. L'identification des différents adduits est présentée sur l'autoradiogramme #B.



Autoradiogrammes 6, 7, 8, 9: autoradiogrammes obtenus suite au marquage radioactif des adduits à l'ADN des cellules non exposées (#6: témoin cellulaire), des cellules exposées à un blé contrôle externe (#7), des cellules exposées à l'OTA à 0,5 μ M (#8) et des cellules exposées à l'OTA à 2,5 μ M (#9).

Autoradiogramme 10 : migration de standards adduits OTA à l'ADN

On ne détecte pas d'adduits à l'ADN, ni dans le témoin cellulaire non exposé (autoradiogramme #6), ni dans l'ADN des cellules exposées à un extrait de blé « contrôle externe » (autoradiogramme #7). Par contre, nous confirmons que l'exposition des cellules à des concentrations même très faibles en OTA (0,5 et 5 μ M) conduit à la formation d'adduits à l'ADN (autoradiogrammes #8 et #9). Nous notons la formation de 4 adduits principaux numérotés de 1 à 4.

Ces adduits ont été quantifiés et les résultats sont présentés dans le tableau 13.

adduits	Nombre d'adduits à l'ADN (adduits/ 10^8 nucléotides)	
	OTA 2,5 μ M	OTA 0,5 μ M
Adduit n°1	5,9	3,1
Adduit n°2	3,4	2,0
Adduit n°3	1,8	2,5
Adduit n°4	1,1	0,9
Adduit n°5	0,5	-
Adduits minoritaires	6,4	1,9
Adduits totaux	18,6	10,4

tableau 13. : quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^8 nucléotides, dans les cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à l'OTA pendant 24heures.

Nous disposons de standards d'adduits OTA qui ont été préparés par le Dr Manderville. Ces standards correspondent à une molécule d'OTA adduitée sur une désoxyguanosine ayant conservé son 3' phosphate nécessaire au marquage radioactif. Ces deux adduits standard O - C8 et C - C8 diffèrent par l'atome « d'arrimage » de l'OTA sur la désoxyguanosine. La structure de ces adduits à l'ADN est présentée ci-après (Figure 19).

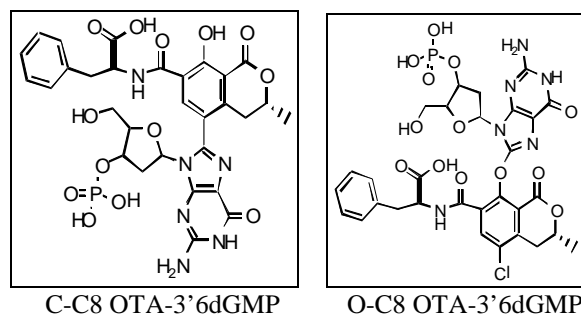


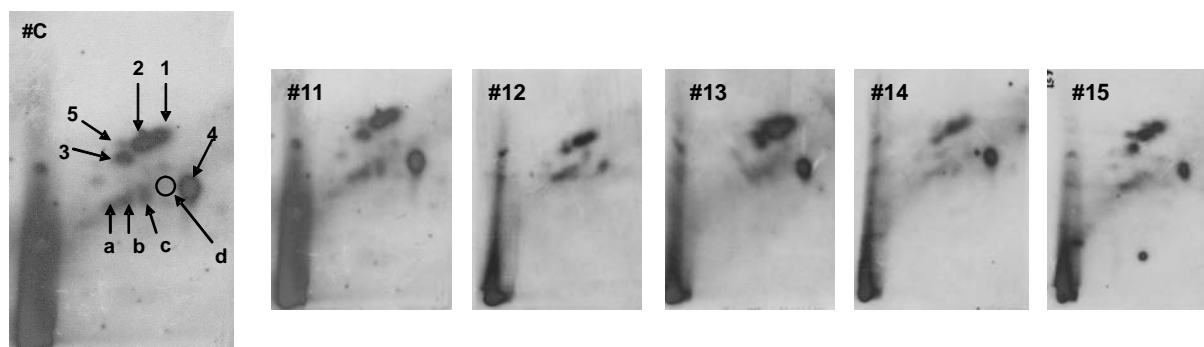
Figure 19. : Structure des adduits standards OTA O-C8 et C-C8 sur la désoxyguanosine monophosphate

Ces adduits ont été post-marqués au P^{32} dans les mêmes conditions que notre ADN. Le profil chromatographique, obtenu après marquage et séparation chromatographique de ces adduits standards, est présenté sur l'autoradiogramme #10 ci-contre.

Seul un adduit, sur les 4 adduits majoritaires détectés à l'ADN des cellules exposées aux concentrations 0,5 et 2,5 μM d'OTA, peut être identifié comme étant l'adduit standard C-C8. En effet, l'adduit n°4 a un profil de migration comparable à celui de l'adduit C-C8. Nous ne visualisons pas la présence de l'adduit O-C8 à l'ADN de ces cellules bronchiques humaines exposées à l'OTA. Les structures chimiques des 3 autres adduits majoritaires, détectés sur l'ADN de ces cellules, ne sont pas identifiées. Ils peuvent être le résultat de l'adduction de la molécule d'OTA sur une autre base, ou de l'adduction d'un métabolite de l'OTA. Le nombre total d'adduits détecté à l'ADN des cellules est supérieur quand les cellules sont exposées à la concentration de 2,5 μM d'OTA ; la quantité d'adduit n°4 (C-C8 OTA) détecté sur l'ADN des cellules exposées à l'OTA est également légèrement supérieure quand les cellules sont exposées à 2,5 μM d'OTA par rapport à l'exposition à 0,5 μM .

2.2.3.2 Potentiel génotoxique des extraits de blé contaminés en OTA sur cellules bronchiques humaines

Les adduits à l'ADN ont été recherchés sur l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé OXBM 01.201, OXBM 01.203, OXBM 01.205, OXBM 01.207, et OXBM 01.208, blés contaminés à divers taux d'OTA et non traités par le procédé Oxygreen®. La numérotation des adduits à l'ADN des cellules exposées à ces extraits de blé est présentée sur l'autoradiogramme #C. Les autoradiogrammes obtenus (Autoradiogrammes 11, 12, 13, 14 et 15) et la quantification des adduits principaux à l'ADN sont présentés dans le tableau 14.

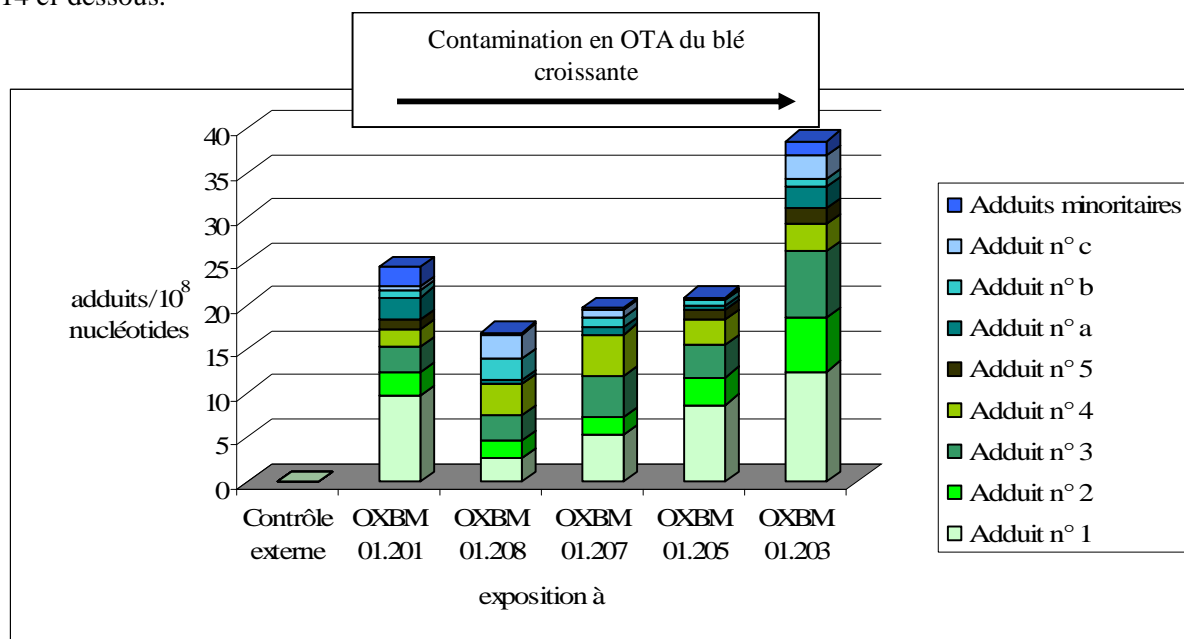


Autoradiogrammes 11, 12, 13, 14 et 15 : autoradiogrammes obtenus après marquage radioactif des adduits à l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé contaminés en OTA OXBM 01.201 (#11), OXBM 01.208 (#12), OXBM 01.207 (#13), OXBM 01.205 (#14) et OXBM 01.203 (#15).

	Nombre d'adduits à l'ADN des cellules WI (adduits/10 ⁸ nucléotides)					
Exposition aux extraits de blé	Contrôle externe	OXBM 01.201	OXBM 01.208	OXBM 01.207	OXBM 01.205	OXBM 01.203
autoradiogrammes	#7	#11	#12	#13	#14	#15
Adduit n° 1	-	9,7	2,6	5,2	8,7	12,5
Adduit n° 2	-	2,7	2	2,1	3,1	6,1
Adduit n° 3	-	2,9	2,9	4,6	3,6	7,5
Adduit n° 4	-	2	3,5	4,8	2,9	3,1
Adduit n° 5	-	1	-	-	1,2	1,7
Adduit n° a	-	2,6	0,5	0,8	0,4	2,5
Adduit n° b	-	0,8	2,4	1	0,6	0,9
Adduit n° c	-	0,4	2,8	0,9	0,3	2,6
Adduits minoritaires	-	2,2	0,2	0,2	0,1	1,7
Total	-	24,3	16,9	19,6	20,9	38,6

tableau 14. : quantification et dénomination des adduits à l'ADN des cellules WI26 exposées à des extraits de blés contaminés à des doses croissantes en OTA (adduits/10⁸ nucléotides).

L'évolution de la quantité de chacun des différents adduits en fonction du niveau de contamination en OTA du blé utilisé pour réaliser l'exposition des cellules est présentée sur le graphe 14 ci-dessous.



Graphe 14. : quantification et dénomination des adduits à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées à des extraits de blés contaminés à des doses croissantes en OTA (adduits/10⁸ nucléotides).

Nous retrouvons le même type d'adduits à l'ADN que ceux identifiés lorsque les cellules pulmonaires sont exposées à de l'OTA pure, et identifiés par les numéros 1, 2, 3 et 4. Nous visualisons en outre, l'apparition de nouveaux adduits, « a », « b », et « c », non détectés dans le cas d'une exposition des cellules à une solution d'OTA. Ces adduits sont fortement présents sur l'ADN des cellules exposées à ces extraits de blé. Nous n'établissons pas de rapport de proportionnalité direct entre le nombre d'adduits à l'ADN quantifié, et le niveau d'exposition des cellules à l'OTA. L'adduit n°4 qui a été identifié comme étant l'adduit C-C8 est également présent sur l'ADN des cellules exposées à ces extraits de blé, et ce, quelle que soit la concentration en OTA présente dans le milieu de

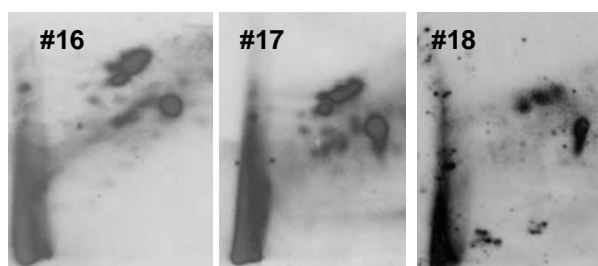
culture. On constate qu'une quantité supérieure d'adduits à l'ADN est formée quand les cellules sont exposées à l'extrait de blé le plus fortement contaminé en OTA. Cependant, une quantité d'adduits également très importante est formée sur l'ADN des cellules exposées au blé OXBM 01.201, contaminé à un très faible taux en OTA. Ceci ne nous permet donc pas d'établir une relation dose/effet entre la concentration en OTA dans le milieu de culture, et la quantité d'adduits détectée sur l'ADN des cellules. Aucun adduit à l'ADN n'est détecté dans des cellules exposées au blé «contrôle externe», non contaminé en OTA.

En résumé, la présence de quantités infimes d'OTA sur le blé (0,5µg d'OTA/kg de blé) conduit à la formation d'adduits à l'ADN des cellules exposées. Cependant, la quantité d'adduits à l'ADN formée suite à l'exposition des cellules à l'extrait OXBM 01.201, est très supérieure à celle détectée quand les cellules sont exposées à des concentrations équivalentes de toxine pure (OTA 0,5µM, autoradiogramme #8). De plus, de nouveaux adduits, absents de l'ADN des cellules exposées aux solutions d'OTA, et par conséquent liés à l'exposition des cellules à cet extrait de blé, sont détectés.

Une qualité particulière de cet extrait de blé, non retrouvé sur le blé contrôle, serait à l'origine de ces adduits.

2.2.3.3 Potentiel génotoxique des extraits de blé traités par le procédé Oxygreen® sur les cellules pulmonaires

Les adduits à l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé traités par le procédé Oxygreen® et contaminés à divers taux d'OTA ont été quantifiés. Les autoradiogrammes (autoradiogrammes #16, 17 et 18) obtenus ainsi que la quantification des adduits (tableau 15) sont présentés ci-après.



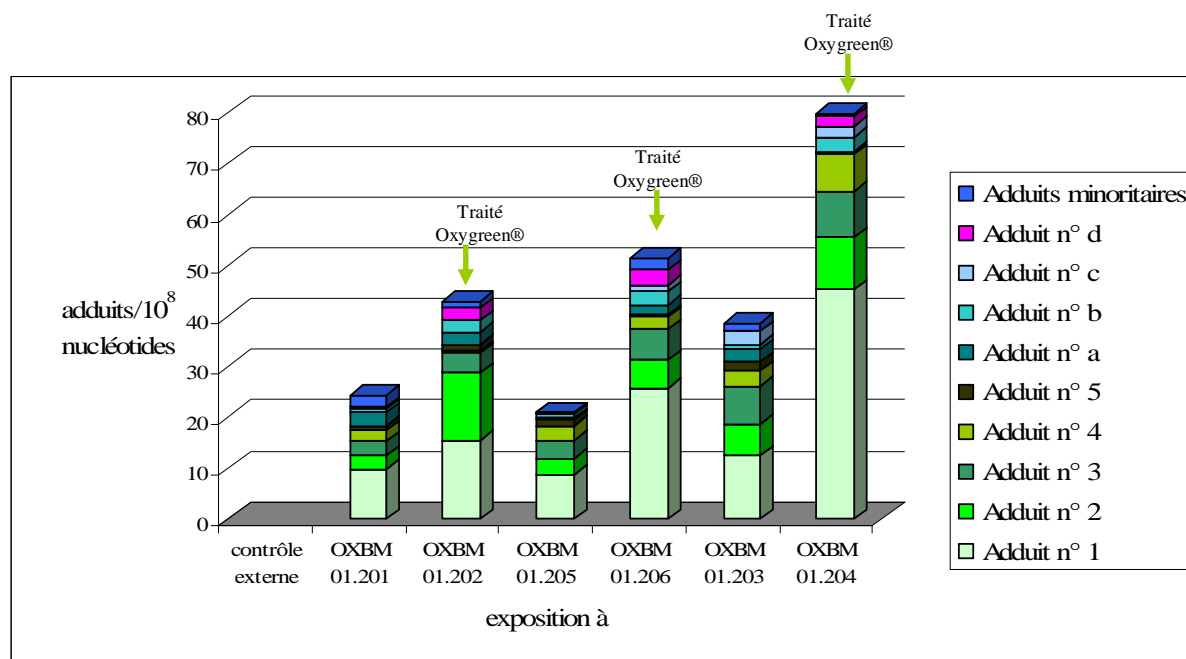
Autoradiogrammes blé Oxygreen® : autoradiogrammes obtenus après marquage radioactif des adduits à l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé contaminés en OTA et traités par le procédé Oxygreen® OXBM 01.202 (#16), OXBM 01.206 (#17), OXBM 01.204 (#18).

Exposition aux extraits de blé	Nombre d'adduits à l'ADN des cellules WI (adduits/10 ⁸ nucléotides)					
	OXBM 01.201	OXBM 01.202	OXBM 01.205	OXBM 01.206	OXBM 01.203	OXBM 01.204
autoradiogrammes	#11	#16	#14	#17	#15	#18
Adduit n° 1	9,7	15,4	8,7	25,8	12,5	45,1
Adduit n° 2	2,7	13,4	3,1	5,5	6,1	10,5
Adduit n° 3	2,9	3,8	3,6	6,0	7,5	9,0
Adduit n° 4	2	0,5	2,9	2,5	3,1	7,3
Adduit n° 5	1	1,2	1,2	0,3	1,7	0,5
Adduit n° a	2,6	2,5	0,4	2,1	2,5	-
Adduit n° b	0,8	2,2	0,6	2,5	0,9	2,9
Adduit n° c	0,4	-	0,3	1,3	2,6	2,1
Adduit n° d	-	2,6	-	3,1	-	2
Adduits minoritaires	2,2	1,3	0,1	2,3	1,7	0,5
Total	24,3	42,9	20,9	51,4	38,6	79,9

tableau 15. : quantification en adduits/10⁸ nucléotides et dénomination des adduits à l'ADN des cellules WI 26 exposées 24 heures aux différents extraits de blé, traités ou non par le procédé Oxygreen®.

Les adduits détectés suite à l'exposition des cellules à un extrait de blé traité par Oxygreen® (OXBM 01.202, OXBM 01.206 ; OXBM 01.204), et suite à l'exposition aux extraits de blé

correspondants, non traités par Oxygreen® (OXBM 01.201 ; OXBM 01.205 ; OXBM 01.203) sont présentés dans le graphe 15 suivant.



Graph 15. : quantification en adduits/10⁸ nucléotides et dénomination des adduits à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées 24 heures aux différents extraits de blé, traités ou non par le procédé Oxygreen®.

D'un point de vue qualitatif, nous retrouvons tous les adduits à l'ADN décrits précédemment quand les cellules étaient exposées à des extraits de blé contaminés en OTA. Nous constatons la formation d'un adduit à l'ADN supplémentaire, l'adduit «d», quand les cellules sont exposées à un extrait de blé traité par le procédé Oxygreen®.

D'un point de vue quantitatif, il apparaît que l'extrait de blé, traité par le procédé Oxygreen®, induit la formation d'adduits à l'ADN en quantité supérieure à celle générée par l'exposition à un extrait de blé non traité. Cette augmentation de l'adduction, suite à l'ozonation du blé utilisé pour réaliser l'exposition des cellules, est observée que le blé soit naturellement ou artificiellement contaminé en OTA, et que la contamination en OTA soit faible ou élevée. L'exposition des cellules à un extrait de blé traité par le procédé Oxygreen® aboutit à la formation d'un taux d'adduits deux fois supérieur à celui détecté dans le cas d'une exposition à un extrait de blé non traité. Par ailleurs, quand les cellules sont exposées à un extrait de blé contaminé à un même taux d'OTA (extraits OXBM 01.204 et OXBM 01.205 tous deux contaminés à 40ppb), la quantité d'adduits formés est supérieure quand l'extrait de blé a été traité par le procédé Oxygreen® (OXBM 01.204), et ce d'un facteur 4. L'adduit n°4, est identifié comme étant un adduit formé par l'adduction directe de la molécule d'OTA sur l'ADN : son intensité varie en fonction du type d'exposition des cellules. L'intensité de cet adduit est réduite quand les cellules sont exposées à l'extrait de blé OXBM 01.202 par rapport à ce observé lors d'une exposition à l'extrait de blé OXBM 01.201. La quantité de cet adduit ne varie par contre pas, que les cellules soient exposées à l'extrait de blé OXBM 01.205 ou à l'extrait de blé OXBM 01.206, et ce bien que la quantité d'OTA présente sur le blé soit réduite par le procédé Oxygreen®. Cet adduit s'intensifie quand les cellules sont exposées à l'extrait de blé OXBM 01.204 par rapport à ce observé lors d'une exposition à l'extrait OXBM 01.203, et ce, bien que la concentration en OTA dans le milieu de culture soit comparativement réduite.

Des modifications sont générées dans ce blé suite à l'application du procédé Oxygreen® sur celui-ci. Ces modifications sont à l'origine d'un effet génotoxique sur les cellules bronchiques humaines. Ceci se traduit d'une part, par l'intensification des adduits déjà identifiés lors de l'exposition à un extrait de blé contaminé en OTA et, d'autre part, en l'apparition d'un nouvel adduit à l'ADN identifié par la lettre «d». L'augmentation de la quantité d'adduits à l'ADN, suite au traitement

du blé par le procédé Oxygreen®, est d'autant plus importante que la contamination en OTA du blé utilisé pour réaliser l'exposition des cellules est élevée.

2.2.4 Conclusions et discussion des résultats concernant le potentiel toxique des extraits de blé traités ou non par le procédé Oxygreen®

L'étude de ce procédé sur le modèle cellulaire épithélial humain met en évidence le fait que le procédé Oxygreen® induit des modifications importantes de la matrice blé lesquelles ont pour effet l'induction d'une cytotoxicité et d'une génotoxicité sur ce modèle. Quel que soit le type d'extrait de blé utilisé pour l'exposition des cellules, une forte mortalité cellulaire est observée pour les concentrations les plus élevées. Cependant, la dilution de l'extrait dans le milieu de culture des cellules permet d'annuler l'effet cytotoxique observé aux concentrations les plus élevées. L'inhibition de la prolifération cellulaire suite à l'exposition des cellules à un extrait de blé ozoné est plus prononcée que celle observée quand les cellules sont exposées à un extrait non traité par le procédé Oxygreen® : des dilutions plus élevées de l'extrait utilisé pour l'exposition sont requises, quand il s'agit de blé ozoné, pour obtenir une prolifération cellulaire correcte. Cette augmentation du potentiel cytotoxique de l'extrait de blé, en relation avec le traitement Oxygreen®, est observé quel que soit le niveau de contamination en OTA du blé. Ceci suggère que cette cytotoxicité n'est pas directement liée à la génération d'un métabolite de l'OTA.

On confirme que des doses même très faibles d'OTA, 0,5 et 2,5µM, peuvent induire la formation d'adduits à l'ADN. Quel que soit le niveau de contamination en OTA de l'extrait testé, on note la présence de l'adduit OTA C-C8 sur l'ADN des cellules. Les résultats obtenus ne nous permettent pas de dégager une relation dose/effet entre le niveau d'exposition à l'OTA des cellules et le nombre total d'adduits à l'ADN formés. Par ailleurs, l'étude du pouvoir génotoxique de ces extraits de blé a montré que ceux-ci étaient capables d'induire la formation d'adduits à l'ADN des cellules pulmonaires exposées aux différents extraits. Cette exposition a pour effet la formation d'adduits à l'ADN « spécifiques » de l'exposition appelés «a», «b», «c». Les adduits 1, 2, 3 et 4, présents sur l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé sont identiques à ceux observés sur l'ADN des cellules exposées à une solution pure d'OTA, mais sont absents de l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé contrôle externe.

L'application du procédé Oxygreen® sur le blé conduit à l'intensification des adduits ainsi qu'à l'apparition d'un nouvel adduit « d », sur l'ADN des cellules pulmonaires exposées aux extraits traités. L'intensification des adduits à l'ADN des cellules exposées au blé traité par le procédé Oxygreen®, est principalement liée à l'augmentation systématique des adduits 1, 2 et 3, adduits qui avaient été mis en évidence sur l'ADN des cellules exposées à la solution d'OTA mais dont la structure est inconnue. Plus particulièrement, les adduits «1» et «3» sont augmentés suite à l'application du traitement Oxygreen® sur le blé contaminé, et ce, en fonction de la dose de contamination en OTA du blé. L'adduit n°4, identifié comme étant l'adduit C-C8 OTA, est tantôt augmenté, tantôt diminué dans les cellules exposées aux extraits de blé traités par Oxygreen® suivant la quantité d'OTA présente dans l'extrait. L'effet « en cloche » observé peut paraître surprenant mais celui-ci s'explique par le fait, qu'à forte dose, l'OTA modifie l'activité de certaines enzymes de métabolisations, conduisant à la formation de ses métabolites réactifs. A faible dose (0,5nM d'OTA), la diminution de l'exposition à l'OTA par le procédé Oxygreen®, permet de réduire la quantité de métabolites formés, et donc, de réduire la quantité d'adduits à l'ADN de type C-C8 OTA formée. Pour l'exposition à l'extrait OXBM 01.203 (exposition à 5µM d'OTA), il est vraisemblable que l'on soit à une dose d'exposition à l'OTA pour laquelle on observe une inhibition des enzymes de métabolisation. La réduction du niveau d'exposition suite à l'application du procédé sur cet extrait de blé, nous ramène à des doses d'exposition pour lesquelles l'effet inhibiteur des enzymes de métabolisation est moindre. Par conséquent, les adduits à l'ADN des cellules exposées à cet extrait de blé OXBM 01.204, traité par Oxygreen®, sont accrus. Pour la dose d'exposition à l'OTA intermédiaire (2µM), la réduction du niveau d'exposition ne conduit pas à une modification de la quantité d'adduits à l'ADN formée. On se situe à un niveau plateau pour lequel la quantité d'OTA n'a

pas d'incidence sur la quantité d'adduits formés. L'évolution de l'adduit « 2 » suit également cette courbe en cloche décrite pour l'adduit « 4 ».

La comparaison de la quantité d'adduits à l'ADN des cellules, formée suite à l'exposition de celles-ci aux extraits OXBM 01.205 et OXBM 01.204, blés contaminés au même taux d'OTA, et respectivement non traités et traités par le procédé Oxygreen®, montre que la quantité d'adduit C-C8 OTA formée est supérieure pour le cas d'une exposition à l'extrait de blé traité par le procédé Oxygreen®. De même, les adduits 1, 2, et 3 sont également amplifiés. L'amplification de l'adduit « 4 » peut s'expliquer par la métabolisation de l'OTA, par oxydation sous l'action de l'ozone. En effet, suite à une réaction d'oxydation, l'OTA est métabolisée en différents composés, dont la forme quinone, capables de réagir avec l'ADN pour former des adduits, notamment le C-C8 (pour une revue, voir Manderville, 2005 ; Faucet-Marquis, 2005 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005).

L'analyse de l'ensemble de ces résultats montre que le traitement Oxygreen® devra être adapté de telle manière à obtenir une décomposition totale de l'OTA, sans formation de métabolites « réactifs ». L'apparition d'adduits spécifiques liés à l'exposition des cellules au blé (« a », « b », « c »), nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les blés entrant dans l'étude avaient des caractéristiques intrinsèques qui pouvaient être à l'origine de cette apparition de la génotoxicité. Ce caractère intrinsèque du blé peut, de plus être modifié, ce qui expliquerait l'amplification de la cytotoxicité et de la génotoxicité observées après traitement par le procédé Oxygreen®.

Nous avons constaté que le blé utilisé au cours de cette étude était un blé dont le temps de chute de Hagberg était très faible (inférieur à 200 secondes). Le temps de chute de Hagberg mesure indirectement l'activité des α -amylases du blé, enzymes dégradant l'amidon. L'activité de ces enzymes est fortement accrue dans des blés germés ou en voie de germination. Un blé pré-germé, ne convient pas, pour des raisons technologiques, à la panification et est généralement dirigé vers l'alimentation animale. L'entrée en germination du grain est caractérisée par la consommation des sucres de réserves par l'embryon et l'activation de l' α -amylase, mais également par l'activation d'autres enzymes, notamment les phospholipases.

L'application du procédé Oxygreen® sur un blé déjà en pré-germination peut expliquer les effets observés quand les cellules sont exposées aux extraits de blé ozonés. Nous avons cherché à vérifier cette hypothèse selon laquelle les effets cytotoxiques et génotoxiques observés quand les cellules étaient exposées à un extrait de blé ozoné venaient du fait que ce blé était en pré-germination. Pour cela, nous avons conduit les mêmes expériences avec des blés non germés, ou avec des blés ayant des temps de chute de Hagberg bas. Les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant.

2.3 Innocuité du procédé Oxygreen® appliqué sur un blé de qualité particulière : le blé germé

2.3.1 Description des lots de blé germés

2.3.1.1 Qualité du blé et temps de chute de Hagberg

Le blé tendre, comme toute céréale doit répondre à des normes strictes de qualité, à la fois sanitaires et technologiques. Les standards qualité Européen sont définis dans le règlement (CE) N°824/2000 de la commission du 19 avril 2000, et concernent divers paramètres. Ainsi, le taux d'humidité du blé tendre ne doit pas excéder 14,5% ; il doit avoir un poids spécifique maximal de 73 kg/hl, un taux minimal de protéines de 10,5% sur matière sèche et par ailleurs, le blé ne doit pas contenir plus de 12% d'éléments qui ne sont pas des céréales de qualité irréprochable. Parmi ces « éléments », on retrouve des grains dégradés (grains échaudés, grains d'origine céréalière différente, grains attaqués par des prédateurs...), des grains mouchetés ou fusariés et des grains germés. Pour être admis en panification, le blé ne doit pas avoir un temps de chute de Hagberg inférieur à 220.

La mesure de ce temps de chute de Hagberg a deux intérêts :

- (i) elle va permettre d'évaluer la valeur d'utilisation des blés

(ii) elle permet de corriger l'activité α -amylasique insuffisante d'une farine par ajout de malt ou d'amylases fongiques en vue de son utilisation en boulangerie.

La détermination de ce temps de chute repose sur la mesure de la viscosité d'un empois formé par la gélatinisation d'une suspension de farine ou de mouture complète, placée dans un bain d'eau bouillante. L'évolution de la viscosité, liée à l'activité des enzymes, est appréciée par le temps mis par un barreau pour traverser la suspension sous l'effet de son propre poids. Le temps de chute de Hagberg est exprimé en secondes. La présence d'une activité α -amylasique importante se traduit par une liquéfaction de l'empois et un temps de chute court. Inversement, un blé à faible activité enzymatique a un temps de chute élevé.

2.3.1.2. Temps de Hagberg des lots de blé germés

Le lot de blé utilisé dans cette étude provient d'une minoterie Bretonne. Ce lot de blé identifié « témoin Meunier » est un blé tendre, de bonne qualité boulangère. Son temps de chute de Hagberg est de 422 secondes, ce qui indique une très faible activité α -amylasique. Les mycotoxines OTA et CIT ont été recherchées sur ce lot de blé sans qu'aucune contamination n'ait été identifiée.

Trois fractions de ce blé « témoin Meunier » ont été placées en milieu humide des durées variables, à l'obscurité, afin d'amorcer les processus de germination. Au terme de l'humidification, chaque fraction est récupérée et le temps de chute de Hagberg est mesuré. Les lots ont été codés OXBT04 G0x pour **Oxygreen® Blé Tendre année 2004 Germination**, suivi des numéros 2,3 et 4 en fonction du temps passé en milieu humide. Une première fraction, OXBT04 G02, placée en milieu humide pendant 72 heures a un temps de chute de Hagberg de 143. La seconde, OXBT04 G03, placée 82 heures en milieu humide a un temps de chute de Hagberg de 132. Enfin, la dernière fraction, OXBT04 G04, placée 96 heures à l'humidité a un temps de chute de 62 secondes. Les trois lots de blé OXBT04 G02, OXBT04 G03 et OXBT04 G04 ont des temps de chute de Hagberg qui rendent leur utilisation en boulangerie délicate, voire impossible. Bien que le temps de séjour des fractions OXBT04 G02 et G03 diffère de 10 heures, le temps de chute de ces blés est identique.

Ces différents lots de blé ont été divisés en deux parts ; l'une a été conservée sans traitement et la seconde a été ozonée par le procédé Oxygreen®. Les paramètres de l'ozonation sont identiques à ceux décrits dans la première partie des résultats, au paragraphe 1.3.2., et utilisés pour la décontamination en OTA du blé. L'identification des différents lots de blé, ainsi que leur indice de chute, sont rappelés dans le tableau 16 ci-dessous.

Lot de blé	Temps de chute de Hagberg
Témoin Meunier	422 secondes
OXBT04 G02	143 secondes
OXBT04 G03	132 secondes
OXBT04 G04	62 secondes

tableau 16. : Identification des différents lots de blé et rappel de leur temps de chute de Hagberg.

Des extraits ont été réalisés, à partir de ces différents lots de blé, selon le protocole d'extraction de l'OTA, protocole suivi précédemment pour réaliser les extraits de blé utilisés pour l'exposition des cellules. Les cellules épithéliales bronchiques humaines ont été exposées aux différents extraits de blé ; la cytotoxicité, la génotoxicité ainsi que l'impact sur les mécanismes de l'inflammation ont été étudiés. Les résultats sont présentés ci-après.

2.3.2 Etude du potentiel cytotoxique des différents lots de blé germés ou non, et traités ou non par le procédé Oxygreen®

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer le potentiel cytotoxique de ces extraits de blé. Nous avons utilisé la méthode au MTT, basée sur l'activité métabolique des cellules et présentée au paragraphe 2.1.2.1 ; celle-ci nous permet d'estimer directement le nombre de cellules vivantes. Nous avons également utilisé la méthode basée sur la mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) qui permet de quantifier le nombre de cellules mortes. La lactate déshydrogénase est une enzyme cytosolique stable, qui sera libérée dans le milieu extracellulaire, suite à la perméabilisation de la membrane cellulaire précédant la lyse cellulaire. Ainsi, la quantification de la LDH est directement

proportionnelle à la quantité de cellules mortes. Ces deux types de tests permettent d'appréhender l'impact cytotoxique d'une molécule, selon deux approches différentes et complémentaires, l'une se basant sur l'activité métabolique des cellules vivantes et l'autre, sur la perméabilité membranaire des cellules mortes. L'utilisation de ces deux types de tests de cytotoxicité permettent de distinguer deux processus différents de la mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, se déroule de façon contrôlée et ordonnée, avec une phase d'initiation, de régulation puis de destruction. Au cours du processus apoptotique, on observe une diminution du volume cellulaire cytoplasmique, une condensation ainsi qu'une fragmentation de la chromatine. L'intégrité des organelles internes est maintenue ainsi que celle des membranes externes. On a formation de corps apoptotiques, sans libération du contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire. A l'inverse, la mort nécrotique intervient suite à un stimulus accidentel ; elle se traduit par une augmentation du volume cytoplasmique des cellules, la perte de l'intégrité membranaire conduisant à la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. La nécrose s'accompagne *in vivo* de réactions inflammatoires.

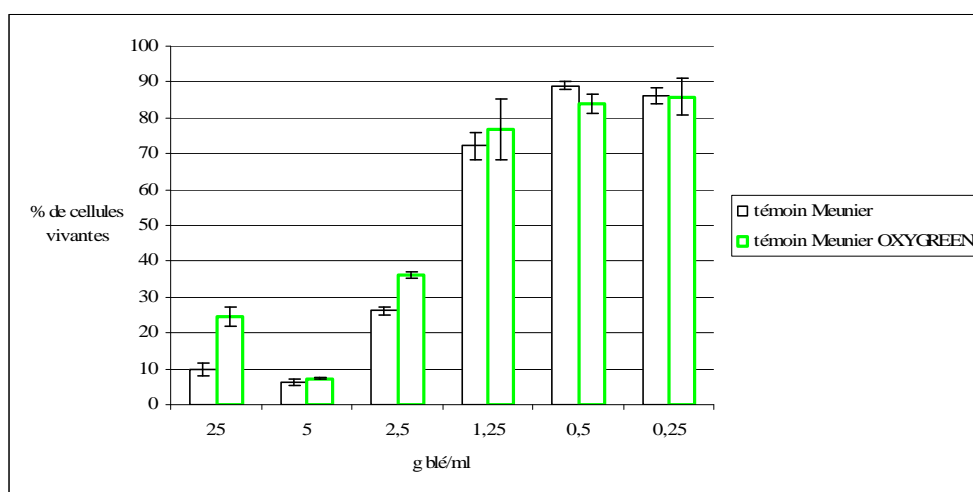
Le test au MTT, révélant un ralentissement de l'activité métabolique des cellules, rend compte des événements apoptotiques et nécrotiques intervenant dans la cellule. La mesure de la concentration en LDH dans le milieu extracellulaire ne pourra pas nous renseigner de façon satisfaisante sur une mortalité cellulaire par apoptose. Il faudra en effet attendre des stades ultimes de l'apoptose pour qu'une nécrose secondaire ait lieu sur les corps apoptotiques, et que ceux-ci libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire. Le test à la LDH permet de mesurer essentiellement la mort nécrotique, au cours de laquelle le contenu cytoplasmique est libéré dans le milieu de culture. Une différence de résultats obtenus par ces deux tests de cytotoxicité est liée à l'existence d'une mort apoptotique. Pour les cas où seule la mort nécrotique intervient, ces deux types de tests donnent les mêmes résultats.

2.3.2.1. Evaluation de l'inhibition de la prolifération cellulaire (test au MTT)

Cinq mille cellules sont disposées dans les puits de la plaque de prolifération cellulaire. L'exposition des cellules débute par addition de 10µl de l'extrait à tester dans le puits de culture et se poursuit pendant 24 heures. Les concentrations en extrait de blé testées dans le puits de culture sont comprises entre 0,25 g/ml et 25g/ml de milieu de culture.

2.3.2.1.1. Exposition des cellules au blé témoin Meunier ozoné ou non ozoné

Les cellules ont été exposées à l'extrait de blé « témoin Meunier », ayant un temps de Hagberg élevé, ainsi qu'à l'extrait obtenu à partir de ce même blé traité par le procédé Oxygreen®. Les résultats obtenus sont présentés sur le graphe 16.



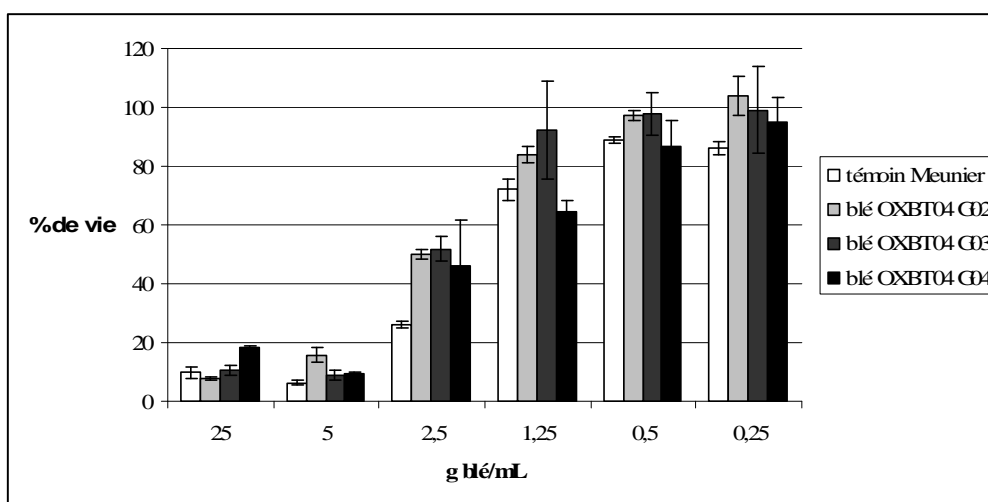
Graphe 16. : évaluation par le test au MTT de la viabilité des cellules épithéliales bronchiques humaines suite à l'exposition de celles-ci à l'extrait de blé témoin traité ou non par le procédé Oxygreen®, pendant 24 heures.

L'exposition des cellules à des concentrations élevées en ces extraits de blé (25, 5 et 2,5 g/ml de milieu de culture) a pour effet une diminution nette de la prolifération cellulaire. L'inhibition de la prolifération cellulaire n'est plus observée quand les cellules sont exposées à des concentrations en blé inférieures à 1,25 g/ml de milieu de culture. Par ailleurs, le profil d'inhibition de la prolifération cellulaire est identique que les cellules soient exposées à un blé traité par le procédé Oxygreen® (témoin Meunier Oxygreen®) ou à un blé non traité (Témoin Meunier).

Ainsi, l'application du procédé Oxygreen® sur ce blé de bonne qualité meunière, non pré germé, n'a pas d'incidence sur le potentiel cytotoxique de celui-ci.

2.3.2.1.2. Exposition des cellules à des extraits de blé germés et incidence sur la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire des cellules pulmonaires exposées aux extraits de blé pré-germé, non traités par le procédé Oxygreen®, a été évaluée : l'exposition a été conduite sur 24 heures avec des concentrations en blé comprises entre 25 et 0,25 g de blé/ml de milieu de culture. Les résultats sont présentés ci-après sur le graphe 17.

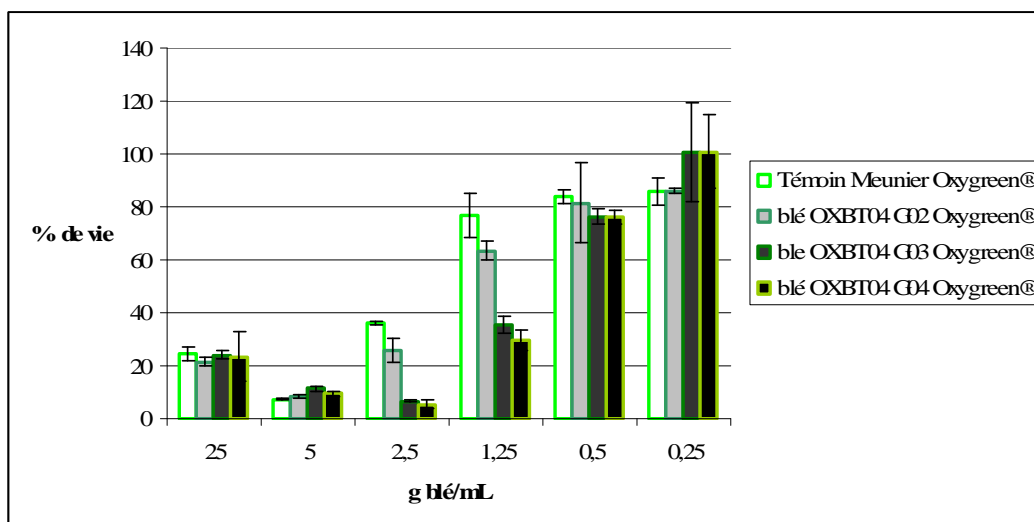


Graphe 17. : évaluation par le test au MTT de la viabilité des cellules après exposition pendant 24h à diverses concentrations en extraits de blé non traités par le procédé Oxygreen®

La prolifération cellulaire est très fortement inhibée, d'un facteur supérieur à 50%, pour des concentrations en blé supérieures à 2,5 g/ml, et ce que le blé testé soit ou non germé. Il semble cependant que le potentiel cytotoxique des blés ayant amorcé la germination soit plus faible que celui du blé témoin Meunier : en effet, pour une exposition à 2,5g/ml de blé, on observe près de 50% de survie en ce qui concerne les cellules exposées aux extraits de blé germés contre 26% de vie seulement, en ce qui concerne les cellules exposées à l'extrait de blé témoin Meunier. Cet effet n'est plus aussi net au cours de l'exposition des cellules à des extraits de blé dilués. L'effet observé est une résultante de deux effets contradictoires : (i) un effet proliférateur lié à la pré-germination du blé, (ii) un effet inhibiteur lié à l'exposition des cellules aux extraits de blé.

2.3.2.1.3 Exposition des cellules à des extraits de blé pré germés, traités par Oxygreen®, et incidence sur la prolifération cellulaire

Les cellules ont été exposées à ces mêmes extraits de blé pré-germés traités par le procédé Oxygreen®, dans les mêmes conditions de concentration et de durée d'exposition. Les résultats obtenus sont présentés ci-après sur le graphe 18.



Graph 18. : évaluation par le test au MTT de la viabilité des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux extraits de blé germés ou non germés et traités par le procédé Oxygreen®.

Nous avons vu qu'un blé non germé et traité par le procédé Oxygreen® (témoin Meunier Oxygreen®) n'avait pas d'impact cytotoxique sur les cellules pulmonaires supérieur à celui du blé non germé, non traité par Oxygreen®, (témoin Meunier), et ce, quelle que soit la concentration en extrait de blé testée.

Par contre, quand les cellules sont exposées à un blé germé traité par le procédé Oxygreen® on observe une inhibition de la prolifération cellulaire par rapport à ce qui est observé pour une exposition à un blé non germé et également traité par Oxygreen® (témoin Meunier Oxygreen®). En ce qui concerne l'exposition aux plus fortes concentrations en extrait de blé, 25 et 5g/ml, on n'observe pas de différence sur la prolifération cellulaire que les cellules soient exposées à un blé traité par Oxygreen® en cours de germination ou non germé. Des différences dans la prolifération cellulaire, en fonction de l'extrait utilisé pour l'exposition, sont observées quand l'exposition est réalisée avec des extraits de blé moins concentrés (2,5 et 1,25g/ml). Dans ces conditions d'exposition, on observe une diminution de la prolifération des cellules exposées aux extraits de blés OXBT04 G02 (25% et 63% de survie respectivement pour les concentrations de 2,5 et 1,25g/ml), OXBT04 G03 (6% et 35% de survie) et OXBT04 G04 (5% et 30% de survie) traités par Oxygreen®, par rapport à la prolifération observée lors de l'exposition à l'extrait de blé non germé et également traité par Oxygreen® soit le témoin Meunier Oxygreen® (36% et 76% de survie respectivement pour les concentrations de 2,5 et 1,25g/ml). L'inhibition de la prolifération des cellules exposées à ces extraits de blé en cours de germination et traités par Oxygreen® est d'autant plus importante que le temps de chute de Hagberg de l'extrait testé est bas, et donc que ce blé est engagé dans le processus de germination.

Les deux lots de blé OXBT04 G02 et G03 ont un temps de chute de Hagberg identique, bien que ceux-ci aient séjourné des durées différentes en milieu humide. Nous observons que les potentiels cytotoxiques de ces deux lots de blés, traités par le procédé Oxygreen®, sont différents, celui du lot G03 étant supérieur à celui du lot G02. Ainsi, la mesure du temps de chute de Hagberg ne nous renseigne que « partiellement » sur l'état de germination du blé en se basant sur l'activité α -amylasique de celui-ci. Bien que les deux lots de blé OXBT04 G02 et G03 aient un même temps de chute de Hagberg, il semble que ceux-ci aient atteint des stades de germination différents, ce qui se traduit ici par un potentiel cytotoxique de l'extrait, après traitement par le procédé Oxygreen®, différent.

2.3.2.2. Evaluation de la mortalité cellulaire, test à la lactate deshydrogénase (LDH)

La mortalité cellulaire a également été étudiée sur le modèle cellulaire pulmonaire en mesurant la quantité de lactate déshydrogénase libérée par les cellules dans le milieu extracellulaire suite à

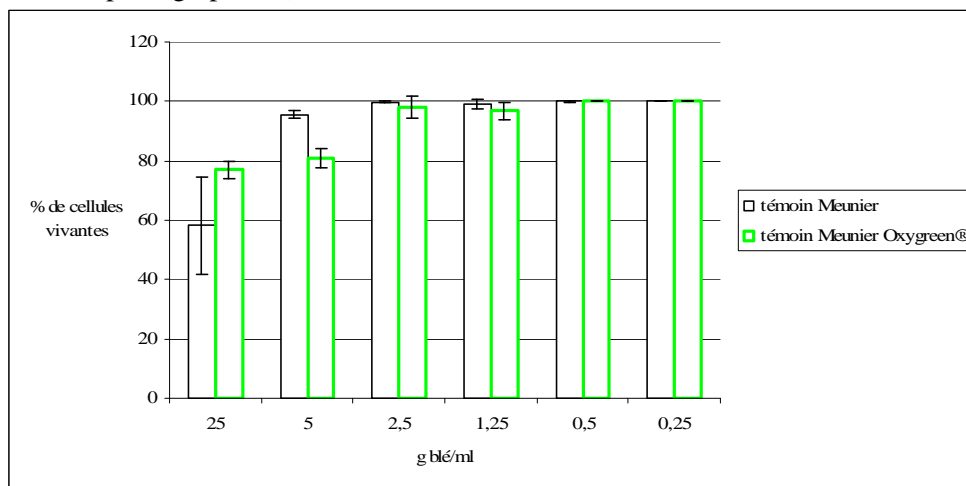
l'exposition de celles-ci aux différents extraits de blé. La quantité de lactate déshydrogénase présente dans le milieu extracellulaire est directement proportionnelle à la quantité de cellules lysées. En conditions normales de prolifération cellulaire, une faible concentration en lactate déshydrogénase est détectée dans le milieu extracellulaire. Celle-ci augmente très nettement suite à la lyse des membranes cellulaires, caractéristique du processus nécrotique.

Chaque puits de la plaque de prolifération cellulaire estensemencé avec 5000 cellules. La quantité de LDH, naturellement libérée par les cellules, est quantifiée dans un puits contenant des cellules non exposées ; cette concentration en LDH est prise comme référent de 0% de mortalité cellulaire (100% de vie). La quantité de LDH libérée, quand la totalité des cellules sont lysées, est déterminée dans les puits de la plaque de prolifération cellulaire suite à la lyse artificielle de toutes les cellules ; ceci nous permet de connaître la concentration en LDH correspondant à 100% de mortalité. Par la suite, la connaissance du niveau basal de LDH dans le milieu extracellulaire, ainsi que celui correspondant à 100% de lyse cellulaire, nous permettra de déterminer le pourcentage de cellules lysées, et donc par déduction le pourcentage de cellules vivantes, dans les puits de la plaque de prolifération en fonction de la concentration en LDH dans le milieu extracellulaire.

En parallèle, une courbe étalon a été réalisée afin d'établir l'existence d'une relation linéaire entre la quantité de cellules lysées, et la concentration en LDH dans le milieu extracellulaire. Cette courbe étalon nous permet de déterminer la quantité de cellules à disposer dans le puits de culture au début de l'exposition afin de pouvoir obtenir une bonne lecture des résultats. En effet, la concentration en LDH dans le cytosol sera variable en fonction du type cellulaire. Afin d'avoir des résultats « lisibles », il est nécessaire que la concentration en LDH ne soit ni trop élevée, ni trop faible. La courbe étalon obtenue pour les cellules pulmonaires est présentée dans le chapitre Matériel et Méthode. Nous avons choisi d'ensemencer les puits de la plaque de prolifération cellulaire avec 5000 cellules. Ces conditions permettent une bonne lecture des résultats et sont, de plus, similaires à celles utilisées pour la réalisation du test au MTT.

2.3.2.2.1. Exposition des cellules au blé témoin non germé ozoné ou non ozoné

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes, ceci afin qu'ils soient plus aisément comparés aux résultats obtenus avec le test au MTT. Les résultats obtenus suite à l'exposition des cellules aux extraits de blé non germés et traités ou non par le procédé Oxygreen® sont présentés ci-après (graphe 19).



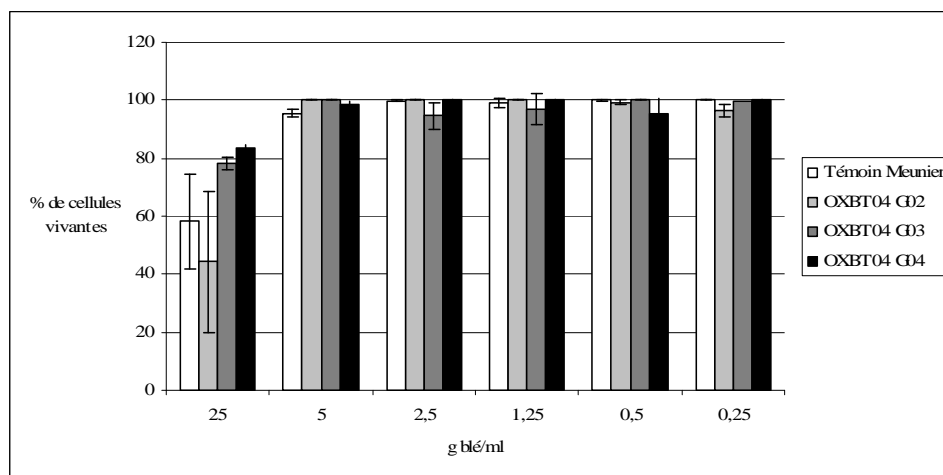
Grappe 19. : évaluation par le test à la LDH de la viabilité des cellules pulmonaires humaines après exposition 24 heures à diverses concentrations en extraits de blé témoin « Meunier », traité ou non par le procédé Oxygreen®.

Il apparaît que, même en ce qui concerne les concentrations en blé les plus élevées, l'analyse de la concentration en LDH dans le milieu extracellulaire ne nous permet pas de mettre en évidence une mortalité cellulaire importante, que l'exposition soit réalisée avec l'extrait de blé témoin Meunier

traité ou non par le procédé Oxygreen®. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas ou peu de mort nécrotique induite par l'exposition des cellules à ces extraits de blé.

2.3.2.2.2. Exposition des cellules à des extraits de blé germés, et incidence sur la prolifération cellulaire

La viabilité des cellules exposées aux extraits de blé germés, non traités par le procédé Oxygreen®, a également été déterminée par l'utilisation de ce test. Les résultats concernant l'exposition des cellules à diverses concentrations en extraits de blés, non traités par Oxygreen®, et germés ou non, sont présentés sur le graphe 20.

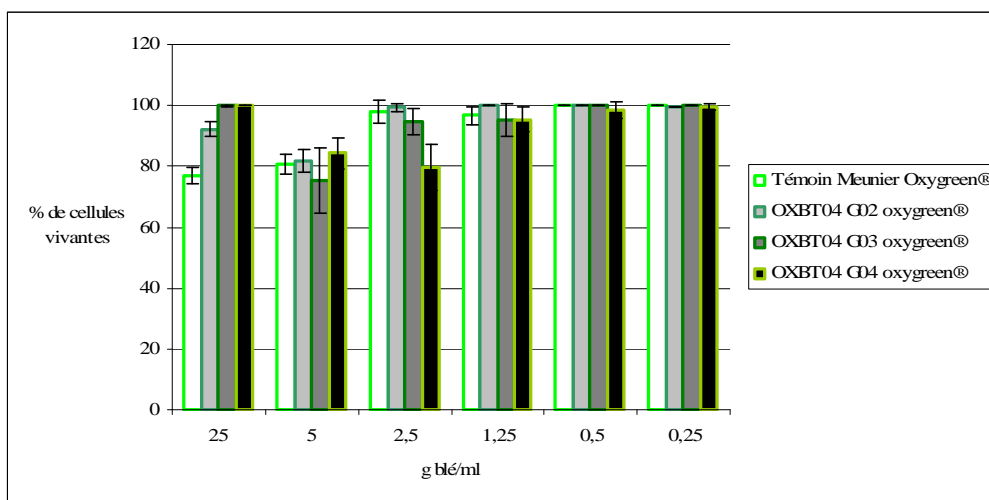


Graphe 20. : évaluation par le test à la LDH de la viabilité des cellules WI26 exposées à différentes concentrations en extraits de blé germés ou non germés.

A la plus forte concentration en extrait de blé testée, les extraits de blé Meunier et OXBT04 G02 induisent une réduction de la viabilité cellulaire respectivement de 40 et 60 % en moyenne. Cet effet inhibiteur sur la prolifération n'est plus observé dès que l'extrait de blé est dilué. En ce qui concerne l'exposition aux extraits de blé OXBT04 G03 et G04, l'inhibition de la prolifération cellulaire maximale observée est de 20%, pour l'exposition à la concentration en extrait de blé la plus élevée. Ainsi, ce test révèle une inhibition de la prolifération cellulaire très modérée suite à l'exposition des cellules à ces extraits de blé germés ou non germés. La réduction de la viabilité cellulaire, observée suite à l'exposition des cellules aux extraits de blé Meunier et OXBT04 G02 à la concentration de 25g/ml, est due à une mort nécrotique qui interviendrait de façon non reproductible.

2.3.2.2.3 Exposition des cellules à des extraits de blé germés, traités par Oxygreen®, et incidence sur la prolifération cellulaire

Les résultats obtenus après exposition des cellules aux extraits de blé pré-germés et traités par le procédé Oxygreen® sont présentés ci-après sur le graphe 21.



Graph 21. : évaluation par le test à la LDH de la viabilité des cellules pulmonaires exposées 24h à différentes concentrations en extraits de blé traités par le procédé Oxygreen® et germés ou non.

Le maximum de mortalité cellulaire observé avec l'utilisation de ce test est de 20% en moyenne. Une mortalité plus importante est visualisée quand les cellules sont exposées à la concentration de 5g de blé par ml par rapport à l'exposition à la concentration de 25 g/ml. Quoiqu'il en soit, la quantification de la concentration extracellulaire en LDH ne nous permet pas de mettre en évidence de façon nette une mortalité cellulaire, que les cellules pulmonaires soient exposées à un blé germé ou non, et que ce blé soit ou non, traité par le procédé Oxygreen®.

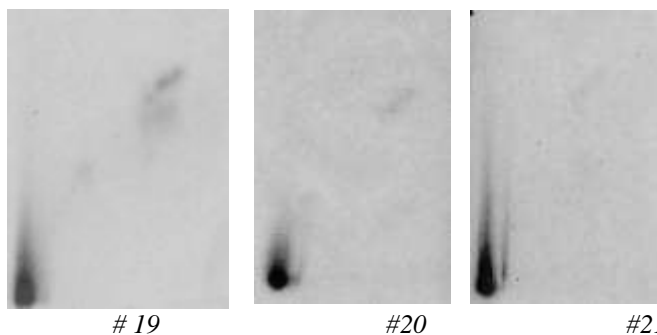
En résumé, cette étude du potentiel cytotoxique, par les tests au MTT et à la LDH, des différents extraits de blé sur le modèle cellulaire bronchique humain nous permet de montrer que l'application du procédé Oxygreen® sur un blé propre et de bonne qualité meunière, tel que le blé témoin Meunier, ne conduit pas à une cytotoxicité. Le traitement par le procédé Oxygreen® d'un blé en pré-germination a, par contre, une incidence sur le potentiel cytotoxique sur le modèle cellulaire pulmonaire. Plus le blé est engagé dans le processus de germination, plus le potentiel cytotoxique de celui-ci, mesuré par le test au MTT, sur le modèle cellulaire pulmonaire, après traitement Oxygreen®, est élevé. L'analyse de la concentration extracellulaire en LDH ne permet pas par contre de mettre en évidence une mort cellulaire. Ceci indique donc que l'intégrité membranaire des cellules exposées à ces extraits de blé est maintenue, et que le processus de mort cellulaire observé avec le test au MTT résulte d'un mécanisme de type apoptotique. Au cours de la germination, on a activation des lipooxygénases, phénomène également induit par l'ozone et donc qui peut expliquer la survenue de la mort apoptotique dans les cellules pulmonaires.

2.3.3 Etude du potentiel génotoxique des extraits de blé germés ou non, et traités ou non par Oxygreen®

Les cellules pulmonaires ont été exposées pendant 24 heures à une concentration en extrait de blé équivalente à 1,25 g de blé par millilitre de milieu de culture. Au terme de l'exposition, les cellules sont récupérées et leur ADN est extrait et purifié. Les adduits à l'ADN (4µg d'ADN marqués) sont ensuite marqués radioactivement comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthode.

2.3.3.1 Potentiel génotoxique de l'extrait de blé non germé, traité ou non par le procédé Oxygreen®

Les adduits formés à l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé témoin Meunier et témoin Meunier Oxygreen® ont été recherchés. Par ailleurs, un témoin cellulaire non exposé est réalisé. Chaque marquage est réalisé en double. Les autoradiogrammes obtenus sont présentés ci-après.



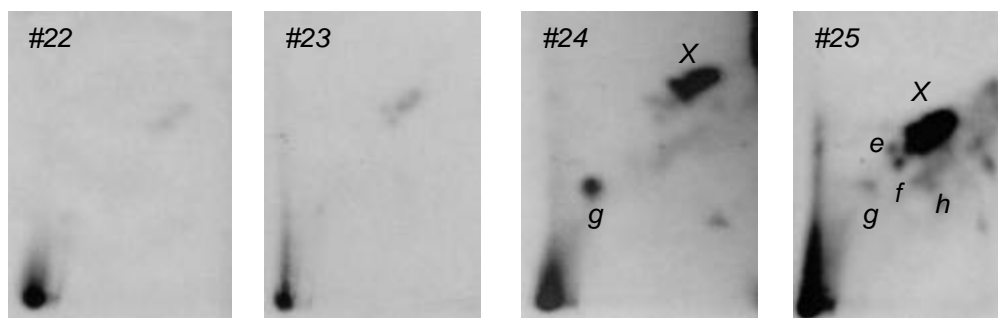
Autoradiogrammes 19, 20, 21 : autoradiogrammes obtenus suite au marquage de l'ADN des cellules pulmonaires non exposées (#19), et exposées aux extraits de blé témoin Meunier (#20) et Témoin Meunier Oxygreen® (#21)

Les adduits que l'on peut observer sur ces films correspondent au bruit de fond, c'est-à-dire à l'éventuel marquage des nucléotides normaux résiduels de l'ADN, ou au marquage de nucléotides de l'ARN : ces adduits sont marqués sur le témoin cellulaire n'ayant reçu aucune exposition. Ces adduits sont en quantités infimes et ne peuvent pas être détectés au bioimager. Ils peuvent par contre être visualisés sur les films radiographiques obtenus après exposition des plaques de migration pendant 72 heures, au congélateur à -80°C , avec un écran amplificateur. Ces adduits sont présents à un taux inférieur à 1 adduit par 10^{10} nucléotides.

Ainsi, aucun adduit n'est détecté sur l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé Meunier et Meunier Oxygreen® : un extrait de blé obtenu à partir d'un blé non germé, de bonne qualité meunière n'induit pas, dans ces conditions d'exposition, la formation d'adduits à l'ADN. L'application du procédé Oxygreen® sur ce même blé ne donne pas lieu à la formation de composés génotoxiques identifiés dans les conditions d'analyses utilisées ici.

2.3.3.2 Potentiel génotoxique des extraits de blé germés

Les autoradiogrammes obtenus après le marquage de l'ADN des cellules pulmonaires exposées aux différents extraits de blé pré-germés et non traités par Oxygreen® sont présentés ci-après (Autoradiogrammes 22, 23, 24, 25)



Autoradiogrammes 22, 23, 24, 25 : adduits observés sur les films radiographiques obtenus suite au marquage des adduits à l'ADN des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux extraits de blé témoin Meunier (#22), OXBT04 G02 (#23), OXBT04 G03 (#24) et OXBT04 G04 (#25).

Des adduits en quantité importante sont détectés sur l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé OXBT04 G03 et G04, blés en pré-germination. En ce qui concerne l'ADN des cellules exposées à l'extrait témoin Meunier (#22), aucun adduit en quantité significative, n'est détecté. Des adduits en quantité très faible sont détectés à l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé OXBT04 G02 (#23).

D'un point de vue qualitatif, les adduits à l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé OXBT04 G03 et G04 migrent de façon similaire à ceux qui ont été détectés sur l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé OXBM 01.201 (Chapitre 2, paragraphe 2.2.3.2). Ainsi, on trouve un amas d'adduits (« X ») ayant des propriétés chromatographiques semblables à celles des adduits 1, 2, 3. L'adduit n°4, qui avait été identifié comme étant l'adduit OTA C-C8 est absent de ces autoradiogrammes. On distingue un nouvel adduit présent sur les autoradiogrammes obtenus après exposition des cellules aux extraits OXBT04 G03 et G04, identifié par la lettre « g ». Par ailleurs, trois

adduits identifiés par les lettres « e », « f », et « h », sont détectés sur l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé OXBT04 G04. La quantification des autres adduits est présentée dans le tableau 17.

essai	Principaux adduits à l'ADN					adduits totaux pour 10^8 nucléotides
	Adduit « X »	adduit e	adduit f	adduit g	adduit h	
Témoin Meunier	<ldq	<ldd	<ldd	<ldd	<ldd	–
OXBT04 G02	0,69 +/- 0,2	<ldd	<ldd	<ldd	<ldd	0,77 +/-0,31
OXBT04 G03	2,57 +/- 1,45	<ldq	<ldq	0,9 +/- 0,16	<ldd	3,74 +/- 1 ,85
OXBT04 G04	11,11 +/- 0,23	0,27 +/- 0,04	0,43 +/- 0,01	<ldq	0,17 +/- 0,02	12,88 +/- 0,15

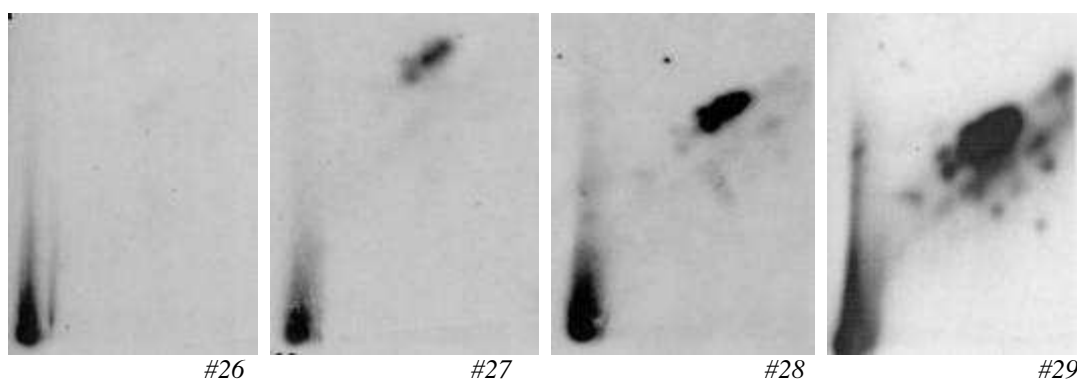
tableau 17. : quantification des adduits à l'ADN des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux différents extraits de blé. Le nombre d'adduits est exprimé en adduits par 10^8 nucléotides. < Ldd : inférieur à la limite de détection ; < ldq : inférieur à la limite de quantification

Il apparaît que le nombre d'adduits à l'ADN des cellules est d'autant plus important que celles-ci sont exposées à un extrait de blé avancé dans le processus de germination. Les adduits « X » ainsi que « e », « f » et « h », sont présents en plus grande quantité sur l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé OXBT04 G04. L'adduit « g » est retrouvé de façon quantifiable dans l'ADN des cellules exposées à l'extrait de blé OXBT04 G03.

Il y a donc production au cours de la germination du blé de molécules réactives qui sont capables d'induire directement ou indirectement, la formation d'adduits à l'ADN.

2.3.3.3 Potentiel génotoxique des extraits de blé germés traités par le procédé Oxygreen®

Les adduits détectés à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées aux extraits de blé pré-germés ou non, et traités par le procédé Oxygreen®, sont présentés sur les autoradiogrammes ci-après (Autoradiogrammes 26, 27, 28, 29).



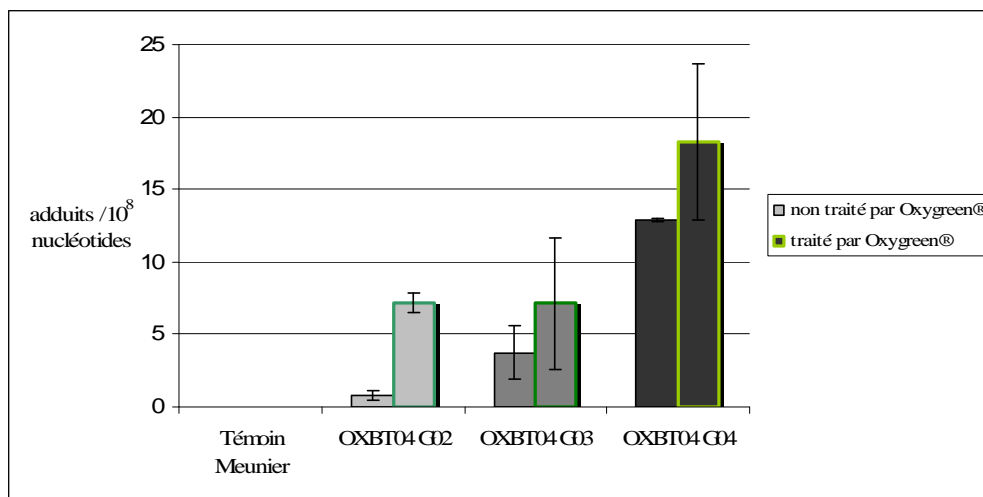
Autoradiogrammes 26, 27, 28, 29 : autoradiogrammes obtenus suite au marquage de l'ADN des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux extraits de blé témoin Meunier traité par Oxygreen® (#26), OXBT04 G02 traité par Oxygreen® (#27), OXBT04 G03 traité par Oxygreen® (#28) et OXBT04 G04 traité par Oxygreen® (#29).

Des adduits à l'ADN sont détectés sur l'ADN des cellules exposées à tous les extraits de blé pré-germés et traités par le procédé Oxygreen®. D'un point de vue qualitatif, on retrouve les adduits X, e, f, g, et h précédemment identifiés sur l'ADN des cellules exposées aux extraits de blé OXBT04 G03 et G04. La quantification des adduits à l'ADN est présentée dans le tableau 18 ci-après.

essai	Principaux adduits à l'ADN					adduits totaux pour 10 ⁸ nucléotides
	adduits X	adduit e	adduit f	adduit g	adduit h	
Témoin Meunier Oxygreen®	<Ldq	<ldd	<ldd	<ldd	<ldd	<ldq
OXBT04 G02 Oxygreen®	6,82+/- 0,65	0,15+/-0,12	0,2+/-0,05	<Ldd	<Ldd	7,17 +/- 0,72
OXBT04 G03 Oxygreen®	6,93+/- 4,25	<Ldd	0,10+/-0,14	<ldd	<ldd	7,12 +/- 4,51
OXBT04 G04 Oxygreen®	15,75+/- 3,66	0,4+/- 0,05	0,66+/-0,1	0,38+/-0,28	0,2+/-0,04	18,3 +/- 5,41

tableau 18. : quantification des adduits à l'ADN des cellules pulmonaires exposées 24 heures aux extraits de blé germés ou non, et traités par le procédé Oxygreen®. ldd : limite de détection ; ldq : limite de quantification.

La quantité d'adduits à l'ADN détectée dans les cellules est d'autant plus importante que le blé traité par Oxygreen® est avancé dans le processus de germination. On détecte ainsi 18,3 +/- 5,41 adduits/ 10⁸ nucléotides dans les cellules exposées à l'extrait de blé OXBT04 G04 traité par Oxygreen® alors qu'on ne détecte pas d'adduits de façon quantifiable dans les cellules exposées à l'extrait Meunier traité par Oxygreen®. Par ailleurs, nous avons vu que l'exposition des cellules à un extrait de blé en pré-germination conduit à la formation d'adduits à l'ADN ; la quantité d'adduits est encore amplifiée quand ce blé germé a été traité par le procédé Oxygreen®, comme visualisé sur le graphe 22.



Graphe 22. comparaison de la quantité d'adduits à l'ADN des cellules bronchiques humaines exposées 24 heures aux extraits de blé pré-germés et traités ou non par le procédé Oxygreen®.

La quantité d'adduits à l'ADN générée par la pré-germination du blé, est augmentée dans les cellules exposées aux extraits de blé pré-germés traités par le procédé Oxygreen®. Cet effet est plus prononcé quand le procédé Oxygreen® est appliqué sur un blé faiblement pré-germé (OXBT 04 G02), car l'ozonation a accéléré la germination du blé, l'amenant à un niveau de germination équivalent à celui des blés OXBT 04 G03 ou G04.

2.3.5. Conclusions

Cette étude, menée avec divers lots de blé plus ou moins avancés dans le processus de germination, nous a permis de confirmer notre hypothèse selon laquelle les effets (cytotoxicité, paragraphe 2.2.2 et génotoxicité paragraphe 2.2.3), observés *in vitro* suite à l'exposition des cellules pulmonaires à des extraits de blé traités par le procédé Oxygreen® pouvaient avoir pour origine la pré-germination du blé.

Il est à noter que l'application du traitement Oxygreen® sur un blé de bonne qualité meunière ne génère ni composés cytotoxiques, ni composés génotoxiques sur le modèle cellulaire pulmonaire.

Le germe des céréales est connu pour avoir une valeur nutritive supérieure à celle des autres parties de la graine, parce qu'il contient plus de vitamines (Price, 1988 ; Yang *et al*, 2001) et d'éléments organiques et minéraux (Lintschinger *et al*, 1997). Le contenu en nutriments du blé évolue en fonction du stade de germination. Le blé atteint sa plus forte teneur en vitamines E, C et β -carotène après 7 jours de germination (Yang *et al*, 2001). Outre ces aspects qui se révèlent bénéfiques d'un point de vue valeur nutritive, l'entrée en phase de germination du grain se traduit par l'induction de plusieurs activités physiologiques et biochimiques, qui lui confèrent des caractéristiques particulières. On a notamment une induction des enzymes protéolytiques qui libèrent des acides aminés, nécessaires au développement de l'embryon, à partir des protéines de réserves présentes dans la couche à aleurone. On a activation des « papaine-like » sérine protéases suite à la germination du grain ; cette enzyme synthétisée au niveau de la couche à aleurone, suite à l'hydratation de la graine, est sécrétée vers l'endosperme pour y dégrader les protéines (Müntz *et al*, 2001). Cette activation des protéases est vraisemblablement initiée dans nos divers lots de blé en pré-germination. Nous avons constaté que l'activité de l' α -amylase est bien induite dans les différents lots de blé pré-germés. D'autres enzymes, en particulier les lipoxigénases et les lipases, sont activées au cours du processus de germination (Kubicka *et al*, 2000) ; la lipoxigénase joue un rôle important au cours de la germination en permettant l'oxydation spécifique des lipides de stockage et en initialisant leur mobilisation comme source d'énergie et de carbone (Feussner, *et al*, 1997). L'induction de la lipase dans le blé en pré-germination conduit à accroître la teneur de ce blé en acides gras mono-insaturés (acide oléique) ou poly-insaturés (acides linoléique, linolénique et arachidonique), libérés suite à l'activité lipasique sur les triglycérides. Il a été montré que l'activité de la lipoxigénase et celle de la lipase étaient plus fortement induites 4 jours après l'initiation de la germination (Kubicka *et al*, 2000). Le lot OXBT 04 G04, lot le plus avancé dans le processus de germination est caractérisé par une teneur en LTB₄ supérieure de 40% à celle des autres lots de blé. Ceci peut être expliqué par les phénomènes d'activations enzymatiques, notamment des lipases et lipoxigénases qui contribuent à la libération d'acide arachidonique et à son oxydation en leucotriènes.

Nous avons constaté que les extraits de blé pré-germés induisaient la formation d'adduits à l'ADN sur les cellules pulmonaires humaines. Ceci peut être mis en parallèle avec l'accumulation au cours du processus de germination de molécules particulières, les acides hydroxamiques. Les acides hydroxamiques cycliques 2,4-dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-(4H)-ones ou DIMBOA et son dérivé déméthylé DIBOA sont retrouvés dans les graminacées, en particulier dans le blé, et ont été impliqués dans les mécanismes de défense développés par la plante pour résister aux agressions des pathogènes et des insectes (Niemeyer, 1988 ; Sicker *et al*, 2003 ; Wilkes *et al*, 1999). Leur structure est présentée ci-après (Figure 20).

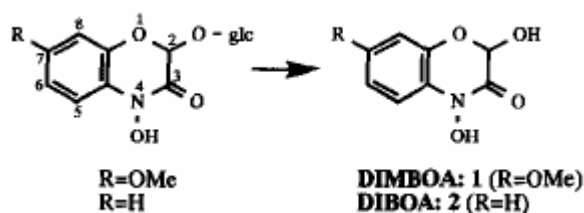


Figure 20. : Structure de la forme glucoside inactive (gauche) et de la forme aglucone active (droite) du DIMBOA et du DIBOA.

Le DIMBOA est le principal acide hydroxamique retrouvé au niveau du blé. Ce composé existe sous forme de β -glucoside stable, et biologiquement inactif, dans les plantes vivantes. Il est converti en aglucones actif par les β -glucosidases au moment de l'entrée en germination. La concentration maximale est atteinte après 78 h de germination puis sa concentration décroît, jusqu'à disparaître quand la plante débute la phase autotrophique (Nakagawa *et al*, 1995 ; Copaja *et al*, 1999). Des quantités d'acides hydroxamiques variables sont accumulées dans les blés pré-germés. Ces composés sont connus pour leurs propriétés pharmacologiques et toxiques comme leurs activités anti-microbiennes, anti-fongiques et mutagènes. Le potentiel mutagène du DIMBOA est observé quand celui-ci est mis en présence d'enzymes de métabolisation. Par ailleurs, le dérivé désoxy- du DIMBOA, le HMBOA, peut être métabolisé par des enzymes d'acétylation présentes dans la fraction S9 en AMBOA (Hashimoto & Shudo, 1996).

La structure de l'HMBOA est présentée ci après (Figure 21).

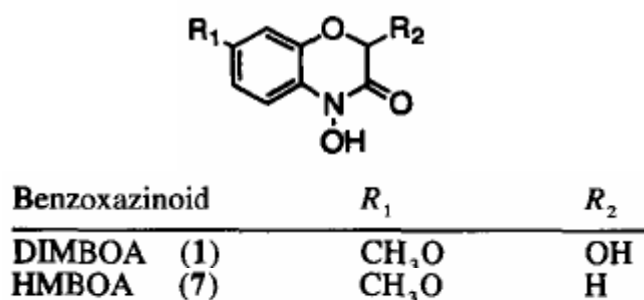


Figure 21. : structure du DIMBOA et de son dérivé désoxy le HMBOA.

Le potentiel oxydant de l'ozone, appliquée sur le blé, peut éventuellement conduire à la formation d'HMBOA à partir du DIMBOA présent dans le blé germé par perte d'un atome d'Oxygène. Lors de l'exposition des cellules à cet extrait de blé, l'HMBOA pourra être métabolisé par les cellules, en son dérivé acétylé réactif AMBOA. L'AMBOA a la capacité de réagir avec l'ADN pour former un adduit au niveau du C8 de la guanine, centre nucléophile de l'ADN (Hashimoto *et al*, 1991 ; Ishizaki *et al*, 1982). La structure de l'AMBOA et la formation d'un adduit à l'ADN sont présentés ci-après (Figure 22).

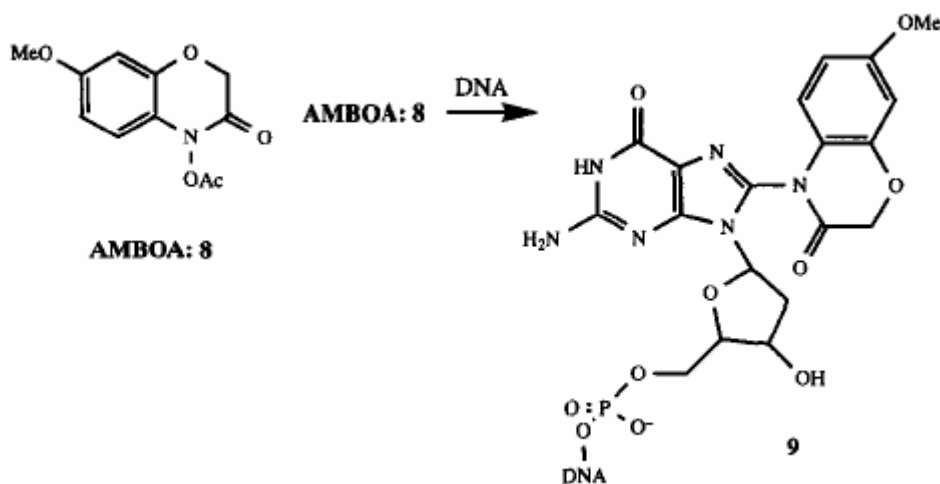


Figure 22. : Structure de l'AMBOA, métabolite acétylé de l'HMBOA, et formation d'un adduit à l'ADN par liaison de l'AMBOA sur le C8 de la guanine D'après Hashimoto *et al*, 1991 ; Ishizaki *et al*, 1982.

De plus, le DIMBOA a la capacité d'inhiber les enzymes de détoxification comme les glutathion transférases et estérases (Mukanganyama *et al*, 2003). Ceci peut aussi contribuer à la toxicité des extraits de blé germés, dans lequel le DIMBOA est produit.

La présence de ces acides hydroxamiques dans des blés pré-germés peut expliquer les adduits à l'ADN des cellules formés suite à l'exposition de celles-ci aux extraits de blé germés. Quand le blé est en pré-germination, celui-ci a des propriétés intrinsèques modifiées, qui sont amplifiées par l'application du procédé Oxygreen®. Les acides hydroxamiques, présents sous forme inactives dans des vacuoles, peuvent être libérés à la suite de l'action de l'ozone sur le blé. De plus, l'action de l'ozone sur les acides hydroxamiques peut également avoir un effet sur leur réactivité ce qui pourrait expliquer la formation d'adduits à l'ADN en quantité plus importante dans les cellules exposées aux blés germés et ozonés.

2.4 Conclusion et discussion générale des résultats concernant l'innocuité du procédé Oxygreen® in vitro

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence le potentiel de l'ozone à dégrader les solutions aqueuses d'OTA et de CIT, jusqu'au stade d'éléments simples comme l'acide chlorhydrique, l'acide carboxylique, l'acide nitrique ou le CO₂. Ces produits n'ont plus d'effets génotoxiques sur les modèles de cellules rénales et pulmonaires. Un effet cytotoxique observé sur les cellules pulmonaires peut être lié à la sensibilité particulière de ces cellules. Celles-ci surexpriment le gène p53, et ne possèdent pas les mêmes capacités de défenses que le modèle de cellules rénales, ce qui les entraîne dans des phénomènes rapides de mort cellulaire.

L'ozonation du blé *via* le procédé Oxygreen® n'a pas conduit, dans les conditions d'humidification et d'ozonation que nous avons appliquées, à la destruction complète de l'ochratoxine A. A certaines concentrations (supérieures à 5µg/kg de blé) de contamination l'abaissement du taux d'OTA n'a pas réduit les effets toxiques (cytotoxique, génotoxique, immunotoxique), et les a parfois amplifiés. Ceci s'explique par le fait que les effets toxiques ne sont pas dus directement à l'OTA mais à un ou plusieurs de ces métabolites, formés lors des réactions d'oxydation, pouvant être favorisées par l'ozone.

L'interprétation des résultats a été compliquée par le fait que le blé, utilisé pour l'ozonation, était en pré-germination. En effet, la pré-germination induit la formation de composés hautement génotoxiques (comme les acides hydroxamiques), dont la formation et/ou la toxicité ont pu être amplifiées par l'application du procédé Oxygreen®. Nous avons confirmé cette hypothèse en menant des essais avec du blé pré-germé et en comparant les résultats obtenus à ceux obtenus avec un blé de qualité meunier.

Cette étude *in vitro* concernant l'innocuité du procédé Oxygreen® indique que l'application du procédé sur un blé de bonne qualité meunière ne génère ni cytotoxicité, ni génotoxicité et que l'ozone est capable de détruire complètement les mycotoxines en solution. Sur des matrices complexes telles que le blé, il conviendra d'affiner les conditions de traitement à l'ozone pour aboutir jusqu'à ce stade ultime de dégradation sans générer de toxicité.

Bien que les études *in vitro* présentent divers avantages évidents tels que (i) la disponibilité d'un matériel expérimental identique sur toute la durée de l'étude, (ii) la facilité de culture dans des milieux définis, (iii) en ce qui concerne les lignées d'origine humaine, l'absence de restriction éthique pour l'obtention des échantillons, elles ne peuvent pas rendre compte des interactions éventuelles avec d'autres constituants ; des mécanismes de métabolisation et de détoxification mis en place à l'échelle de l'organisme ; de la variabilité interindividuelle ou sexuelle ; ou des impacts toxiques de la molécule testée à long terme. C'est la raison pour laquelle, l'innocuité du procédé Oxygreen® a été étudiée *in vivo*, au cours d'une étude sub-chronique sur des rats mâles et femelles de la race Dark Agouty.

Chapitre 3 : Etude sub-chronique d'une exposition de rats à l'OTA : toxicocinétique, toxicité générale et génotoxicité de l'OTA *in vivo*

L'OTA a été mise en relation avec différentes maladies chez l'homme et chez l'animal. Elle est considérée comme le principal agent causal des néphropathies observées chez le porc (Krogh *et al*, 1974, Krogh, 1977, Stoev *et al*, 1998). Chez l'homme, l'OTA est associée à la Néphropathie Endémique des Balkans (BEN), ainsi qu'au cancer des voies urinaires supérieures (UTT). Bien qu'un lien direct entre, l'OTA et la BEN, ou, entre l'OTA et l'UTT reste à établir, plusieurs études épidémiologiques ont pu mettre en parallèle l'exposition humaine à l'OTA *via* l'alimentation et l'apparition de ces maladies (Radic *et al*, 1997, Abouzied *et al*, 2002 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002a ; Vrabcheva *et al*, 2004). En outre, l'OTA est immunotoxique, tératogène, génotoxique et hépatotoxique (pour une revue voir Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 1999, 2002 ; O'Brien & Dietrich, 2005). Il a été suggéré que l'OTA exerçait sa toxicité *via* une induction de l'apoptose (Schwerdt *et al*, 1999a ; Gekle *et al*, 2000), l'inhibition de la synthèse protéique (Creppy *et al*, 1983a, 1983b), l'inhibition de la respiration mitochondriale (Meisner *et al*, 1974), des effets sur le métabolisme des glucides (Meisner & Selanik, 1979 ; Verma & Shalini, 1998), des effets sur le métabolisme des lipides (Rahimtula *et al*, 1988) ou *via* la génération d'adduits à l'ADN (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1991, 1993 ; Azemar *et al*, 1997 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005). Cependant, il n'a toujours pas été élucidé, si le mécanisme prédominant intervenant dans la génotoxicité de l'OTA, est de type direct ou indirect. Le mécanisme indirect serait lié à la production d'espèces réactives de l'oxygène, suite à l'exposition à l'OTA, qui pourraient réagir de façon indirecte avec l'ADN, ou, interférer avec les processus de réparation (pour une revue, voir Turesky, 2005). L'effet direct serait lié à la liaison de la molécule, ou d'un de ses métabolites, à l'ADN. La capacité de l'OTA à former des adduits à l'ADN de façon directe, ou suite à sa métabolisation *in vivo*, a été mise en évidence récemment (Faucet *et al*, 2004 ; pour des revues, voir Manderville, 2005 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005 ; Manderville & Pfohl-Leszkowicz, 2006).

La toxicité de l'OTA est soumise à d'importantes variations inter-espèces, et est également dépendante du sexe, ou même de l'âge (Grosse *et al*, 1995 ; Castegnaro *et al*, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998 ; Dortant *et al*, 2001 ; O'Brien *et al*, 2001). La mise en place d'études *in vivo*, sur la toxicité et la distribution de l'OTA dans l'organisme, doit permettre de mieux appréhender les mécanismes toxiques impliqués, et de fournir la meilleure estimation possible concernant la dose journalière tolérable pour l'exposition à cette toxine. Il faut également tenir compte du fait que la toxicité de l'OTA est dépendante de la dose, mais également du mode d'administration de celle-ci. Dans cette étude *in vivo*, nous nous sommes placés dans des conditions d'exposition les plus proches de celles rencontrées par l'homme, afin de pouvoir mimer au mieux l'effet d'une exposition sub-chronique à l'OTA.

3.1 Mise en place de l'étude et exposition des rats à l'OTA

3.1.1 Description du modèle d'étude *in vivo*

Cette étude *in vivo* a été réalisée sur des rats mâles et femelles de la race Dark Agouty. Cette race a déjà été utilisée dans une étude *in vivo* sur l'OTA car ces animaux présentaient une susceptibilité particulière concernant le métabolisme de la débrisoquine (Castegnaro *et al*, 1989, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998, 2002b). Au cours de cette étude, les animaux mâles exposés à l'OTA, par intubation gastrique se sont révélés plus sensibles que les rats mâles de la race Lewis pour la formation de lésions au niveau rénal, ainsi que pour la génération d'adduits à l'ADN. La race Dark Agouty a démontré une sensibilité à la toxicité de l'OTA dépendante du sexe. Les rats femelles ne développent pas de lésions au niveau rénal, sont plus résistantes à la formation des tumeurs et présentent un nombre d'adduits à l'ADN moindre.

Ces animaux, sensibles à l'OTA, rendant compte de la variabilité existant inter-sexe, sont un bon modèle d'étude des effets toxiques liés à une exposition subchronique à l'OTA.

Les lots de blés reçus par les animaux sont les lots de blé OXBM décrits au chapitre 1

- le groupe 1 a reçu le lot de blé OXBM 01.201, non artificiellement contaminé en OTA
- le groupe 3 a reçu le lot de blé contaminé à 2,5ppb
- le groupe 4 a reçu le lot de blé OXBM 01.207 contaminé à 7ppb
- le groupe 5 a reçu le lot de blé OXBM 01.205 contaminé à 40ppb
- le groupe 6 a reçu le blé OXBM 01.203 contaminé à 100ppb.

Chaque groupe est constitué de 5 rats mâles et de 5 rats femelles. Au cours de l'étude, la consommation en blé des animaux, ainsi que l'évolution pondérale, ont été suivies. Divers paramètres physiologiques et biologiques ont été étudiés. Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

3.1.2 Alimentation des animaux et exposition des rats à l'OTA

La quantité de blé ingérée en 28 jours par les rats ainsi que l'exposition des rats à l'OTA, en fonction du niveau de contamination de l'aliment, sont rapportés dans les tableaux 19 et 20.

Contamination du blé (ppb)	groupes femelles	Consommation journalière de blé (g/jour)	Exposition journalière à l'OTA ($\mu\text{g/kg pc/jour}$)
0,50	1 (contrôle)	9,94 +/- 0,39	0,044 +/- 0,002
2,5	3	9,96 +/- 0,67	0,172 +/- 0,004
7	4	10,60 +/- 0,42	0,494 +/- 0,029
40	5	10,76 +/- 0,49	3,5 +/- 0,17
100	6	10,67 +/- 0,4	8,482 +/- 0,444

tableau 19. : contamination en OTA du blé, consommation journalière de blé et exposition à l'OTA des rats femelles des différents groupes

Contamination du blé (ppb)	groupes mâles	Consommation journalière de blé (g/jour)	Exposition journalière à l'OTA ($\mu\text{g/kg pc/jour}$)
0,50	1 (contrôle)	11,69 +/- 0,79	0,043 +/- 0,003
2,5	3	11,90 +/- 1,14	0,168 +/- 0,008
7	4	12,31 +/- 0,97	0,467 +/- 0,026
40	5	12,26 +/- 1,39	3,465 +/- 0,134
100	6	11,93 +/- 1	8,151 +/- 0,854

tableau 20. : contamination en OTA du blé, consommation journalière de blé et exposition à l'OTA des rats mâles des différents groupes

La consommation en blé des rats mâles et femelles n'est pas modifiée de façon significative par la présence d'OTA dans l'aliment. Par conséquent, l'exposition des animaux est directement liée au niveau de contamination en OTA du blé. Les rats femelles sont exposés à des doses d'OTA supérieures de 1 à 3 % à celles des rats mâles.

Les rats du groupe 1 sont théoriquement des rats « témoins ». Cependant, le blé que ceux-ci ont reçu contenait une très faible contamination naturelle en OTA ($0,5\mu\text{g/kg}$), conduisant à une exposition journalière de 40 ng/kg pc et par jour en moyenne. Cette exposition ne peut être négligée ; cependant, ce groupe sera tout de même considéré comme le groupe de référence.

Pour l'homme, la dose journalière tolérable a été établie en 1990 par la JECFA à 16ng/kg pc/jour , d'après les données concernant l'apparition des effets néphrotoxiques chez le porc. La DJT a été calculée à partir de la NEL (« no effect level »), déterminée chez le porc, à laquelle un facteur de sécurité de 500 a été appliqué. La NEL est la dose pour laquelle aucun effet nocif, y compris des modifications biochimiques mineures, n'est observé sur l'organe cible (Boorman, 1989). Elle est de $8\mu\text{g/kg pc}$ chez le porc. Il a été proposé par la suite, considérant les effets cancérogènes de l'OTA

indéniables chez l'animal, et possibles chez l'homme, que celle-ci n'excède pas 5ng/kg pc et par jour (Kuiper-Goodman, 1991).

La dose de 5ng/kg pc et par jour a été établie à partir de la dose n'entraînant pas de cancer chez le rat au niveau du rein. Un facteur de sécurité de 5000, appliqué à la dose NEL sur le développement de cancer (28 µg/kg pc), a permis d'obtenir cette valeur de 5ng/kg pc et par jour.

Les rats du groupe 1 sont exposés à 40ng d'OTA/kg pc/jour, soit à une dose 8 fois supérieure à la dose journalière admissible recommandée pour l'homme par le Comité de l'alimentation humaine Européen. Cette dose correspond néanmoins à une dose inférieure d'un facteur 200 à la dose NEL déterminée chez le porc, et, inférieure d'un facteur 600 à la dose sans effet pour l'apparition du cancer rénal chez le rat. Il a été montré que l'OTA a une demi-vie très longue chez l'homme, de l'ordre de 35 jours (Schlatter *et al*, 1996 ; Studer-Rohr *et al*, 2000) alors qu'elle est comprise entre 55 et 120 heures chez le rat. Considérant, la demi-vie d'élimination de l'OTA chez le rat, les données à partir desquelles la DJT a été établie, et enfin, le facteur de sécurité appliqué à la NEL pour l'établissement de la DJT, il est probable que la dose journalière d'exposition de 40 ng/kg pc soit sans effet chez le rat. La dose d'exposition la plus élevée testée ici, soit 8500 ng/kg pc/jour, correspond à la dose NEL déterminée chez le porc, mais est 3 fois inférieure à la dose induisant le développement de cancers chez le rat.

3.2 Toxicocinétique de l'OTA

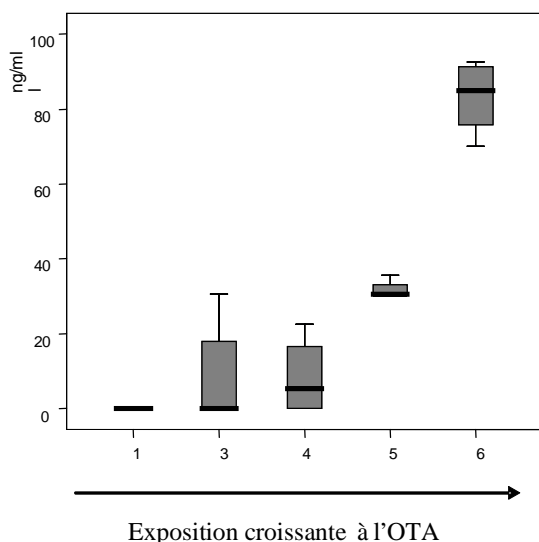
Une fois ingérée, l'OTA est absorbée au niveau de l'estomac et de l'intestin où elle rejoint le compartiment sanguin. Elle est acheminée vers les différents organes où elle sera métabolisée et excrétée par les urines ou les fèces. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au passage de l'OTA dans le compartiment sanguin.

3.2.1 OTA sérique

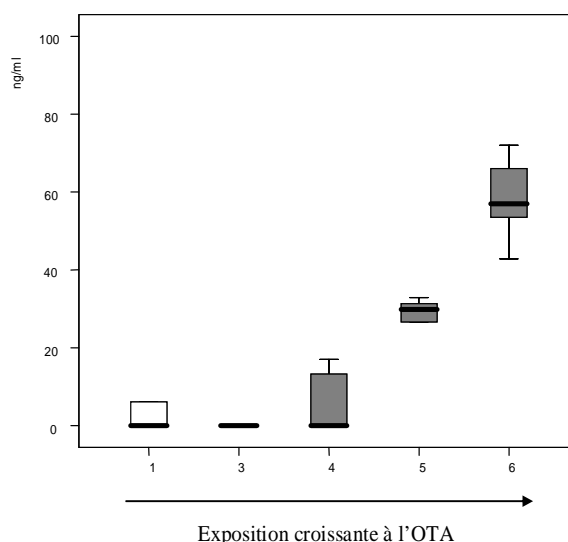
L'OTA a été recherchée dans le sérum des rats mâles au 28^{ème} jour de l'expérience. Un millilitre de sang récupéré à la fin de la période de traitement des animaux, 14 heures après la dernière prise d'aliment, a été centrifugé afin d'en récupérer la fraction plasmatique. Le plasma a été congelé dans l'attente des analyses. L'OTA, ainsi que ses métabolites ont été extraits selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes.

Les résultats sont analysés avec un logiciel statistique permettant la représentation des données sous forme de « boîte à moustache » (voir description complète dans le chapitre Matériel et Méthode).

Les résultats obtenus sont présentés ci-après (graphe 23 et 24, rats femelles et mâles).



Grappe 23



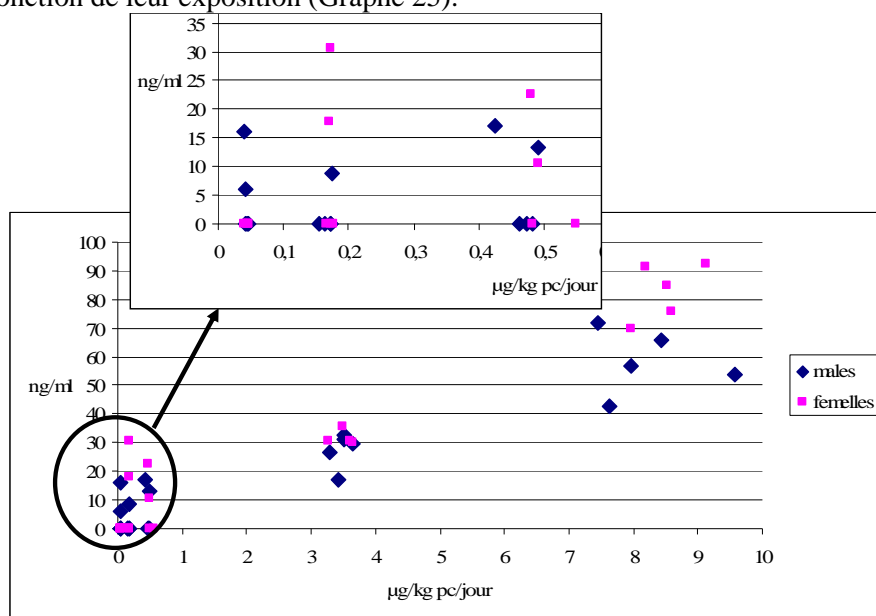
Grappe 24

Grappe 23. : concentration plasmatique en OTA, exprimé en ng/ml, chez les rats femelles.

Grappe 24. : concentration plasmatique en OTA, exprimé en ng/ml chez les rats mâles des différents groupes

La concentration en OTA dans le plasma des rats femelles et mâles augmente en fonction de l'exposition des animaux. On ne détecte pas d'OTA dans le sang des rats femelles du groupe 1, alors que l'on en détecte chez certains rats mâles du groupe 1 (jusqu'à 16ng/ml, valeur exclue par le logiciel statistique). Le taux plasmatique en OTA est supérieur d'environ 1,3 fois, chez les rats femelles du groupe 6, exposés à 8,5 $\mu\text{g/kg pc/jour}$, par rapport à celui des rats mâles du même groupe.

La concentration plasmatique en OTA n'est pas directement proportionnelle à l'exposition des animaux. Nous avons présenté ci-dessous la concentration plasmatique en OTA chez les rats mâles et femelles en fonction de leur exposition (Graphe 25).



Graphe 25. : Evolution de la concentration plasmatique en OTA , en ng/ml, en fonction de la dose d'exposition des rats mâles et femelles, en ng/kg pc/jour.

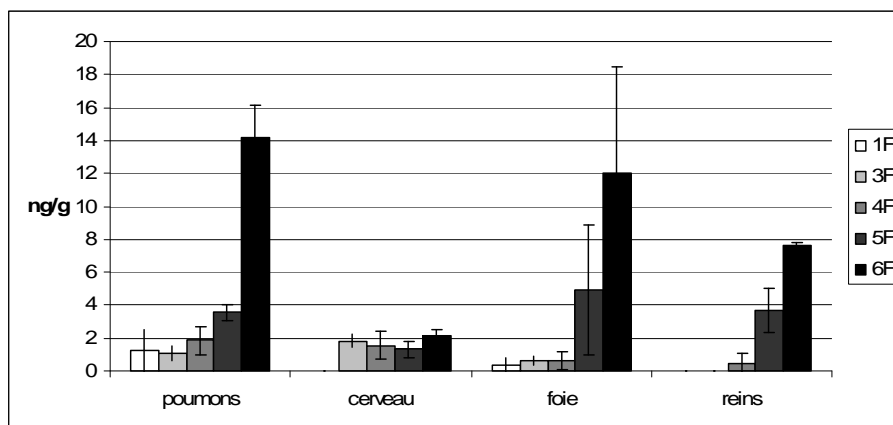
La concentration plasmatique en OTA des rats du groupe 1 est, pour certains animaux, très élevée alors que ceux-ci sont exposés à des doses d'OTA faibles (40 ng/kg pc/jour). De même, des doses d'exposition faibles (inférieures à 1 $\mu\text{g/kg pc/jour}$) peuvent conduire à la présence de quantités non négligeables d'OTA dans le sérum des rats, pouvant atteindre 30ng/ml de sérum (cf zone zoomée du graphe 44). Des concentrations plasmatiques en OTA similaires sont observées également pour des expositions plus importantes, à des doses de 4 $\mu\text{g/kg pc/jour}$ d'OTA. Les animaux ont été privés de nourriture pendant au moins 14 heures avant ces prélèvements de sang : ceci a favorisé le relargage de l'OTA stockée dans les organes vers le compartiment sanguin, expliquant que l'on retrouve un taux « anormalement » élevé chez les animaux exposés à de faibles doses. Les métabolites de l'OTA n'ont pas été détectés dans le sang des animaux : ceux-ci ont une demi-vie relativement courte, et ont été éliminés pendant ce laps de temps.

L'étude exclusive de la concentration plasmatique ponctuelle en OTA des rats ne renseigne pas de façon totalement satisfaisante sur l'exposition de ceux-ci, tout au moins en ce qui concerne des doses d'exposition peu élevées.

3.2.2 Distribution et métabolisation de l'OTA

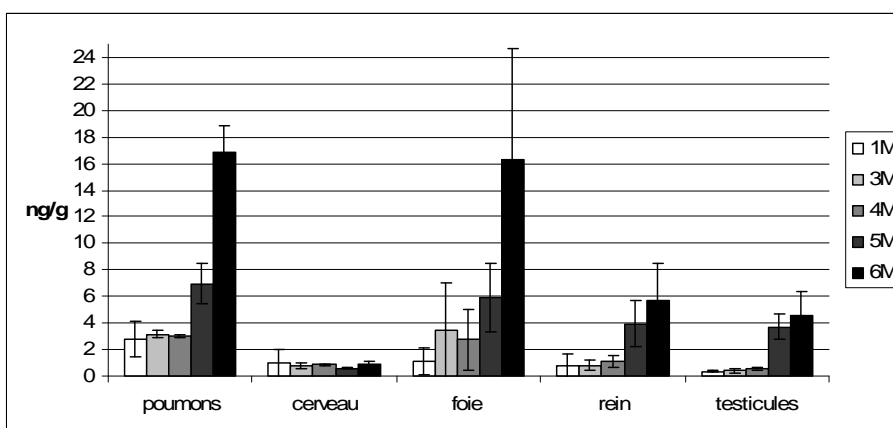
3.2.2.1 Distribution de l'OTA dans les différents organes

L'OTA, ainsi que ses métabolites, ont été extraits à partir du rein, du foie, du cerveau, des poumons des rats femelles et mâles ainsi qu'à partir des testicules des rats mâles. Les concentrations moyennes en OTA dans les organes des rats femelles et mâles sont présentées dans les graphes ci-après (Graphes 26 et 27). Il y a, au sein des groupes de rats mâles et femelles, une forte variabilité en ce qui concerne le taux d'OTA dans les organes des animaux. Cette variabilité est d'autant plus importante que les groupes sont exposés à des fortes concentrations en OTA.



Graph 26. : concentration en OTA dans les différents organes : poumons, cerveau, foie et rein, exprimée en ng d'OTA/g d'organe, en fonction du niveau d'exposition des rats femelles à l'OTA.

Chez les femelles, les concentrations en OTA, retrouvées dans les poumons, sont généralement plus élevées que celles détectées dans le foie pour les faibles doses d'exposition. Pour les deux plus fortes doses d'exposition, une quantité équivalente, voire supérieure, est observée dans le foie des rats femelles. Pour les plus faibles doses d'exposition, on ne détecte pas d'OTA dans le rein. A la dose intermédiaire d'exposition des concentrations équivalentes en OTA sont retrouvées dans le rein et le foie des rats femelles (groupe 5). Pour la forte exposition, les femelles accumulent plus d'OTA dans leur foie que dans leur rein.

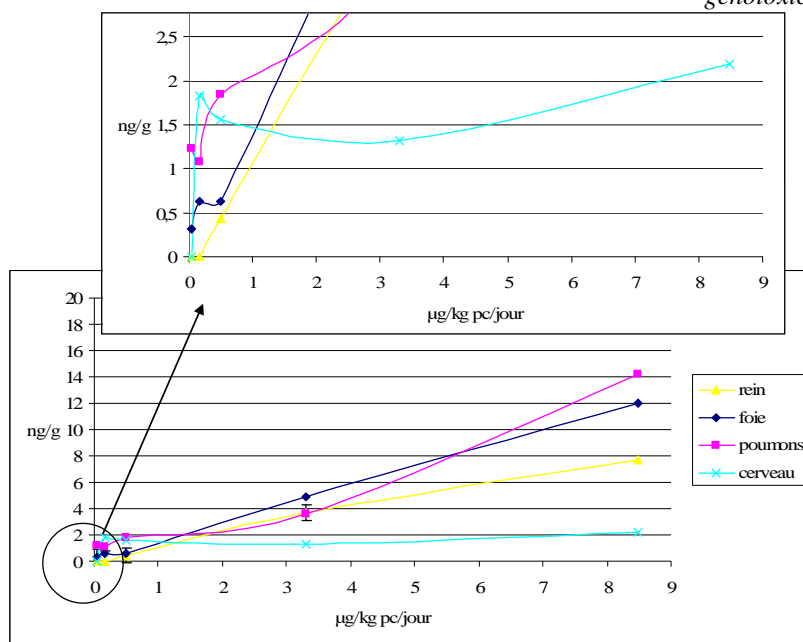


Graph 27. : concentration en OTA dans les différents organes : poumons, testicules, cerveau, foie et rein, exprimé en ng d'OTA/g d'organe, en fonction du niveau d'exposition des rats mâles à l'OTA.

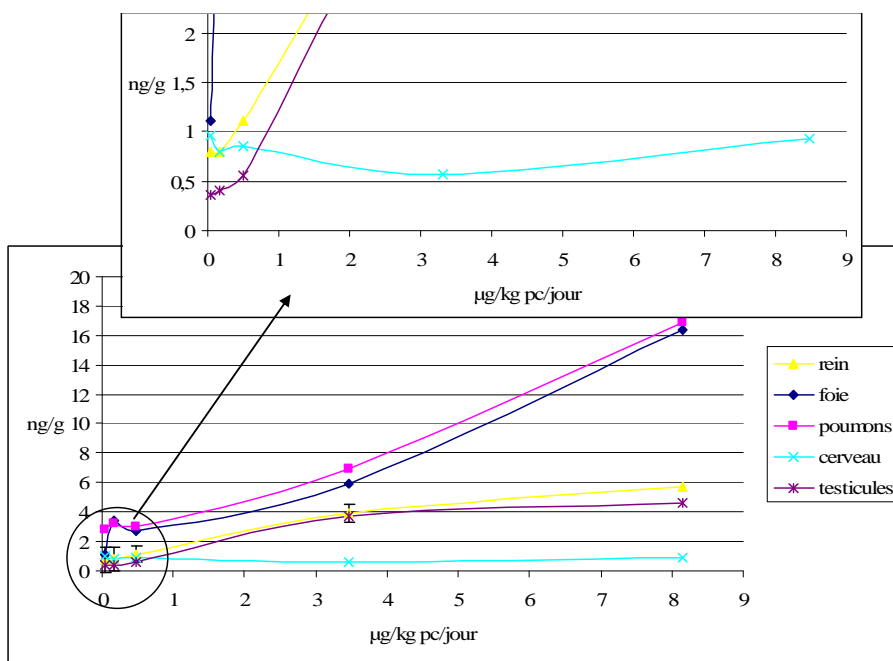
Chez les mâles, les quantités d'OTA retrouvées dans les poumons et dans le foie sont similaires. La quantité d'OTA dans le rein des rats mâles est inférieure à celle présente dans le foie ou les poumons. Les rats mâles accumulent autant d'OTA dans leurs reins que dans leurs testicules. La quantité d'OTA accumulée dans le foie des rats mâles est supérieure à celle accumulée dans le foie des rats femelles.

Le cerveau des femelles et des mâles contient également une faible quantité d'OTA, stable quelle que soit l'exposition des rats.

En fonction du type d'organe, le stockage de l'OTA est proportionnel, ou pas, à l'exposition des rats. La concentration en OTA dans les organes des rats femelles et mâles, en fonction de l'exposition de ceux-ci à l'OTA est présentée sur les graphes 28 et 29.



Graph 28. : évolution de la concentration moyenne en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats femelles en fonction de l'exposition des animaux, exprimé en μg/kg pc/jour).



Graph 29. : évolution de la concentration moyenne en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats mâles en fonction de l'exposition des animaux, exprimé en μg/kg pc/jour).

Aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles, on distingue trois modalités concernant le stockage de l'OTA :

- la concentration en OTA dans l'organe augmente de façon proportionnelle à l'exposition des animaux. Ceci est observé au niveau des poumons, et du foie des rats femelles et mâles, ainsi qu'au niveau du rein des rats femelles.

- la concentration en OTA dans l'organe augmente avec l'exposition jusqu'à un certain seuil, puis se stabilise à une concentration plateau. Ceci est observé au niveau du rein des rats mâles, et au

niveau des testicules. Au niveau de ces organes, il semble qu'il y ait une saturation du stockage, phénomène non observé dans le rein des rats femelles.

- la concentration en OTA dans l'organe est indépendante de l'exposition des animaux et reste à une valeur faible quelle que soit l'exposition des rats. Ceci est observé au niveau du cerveau des rats mâles et femelles.

Il apparaît qu'en fonction de l'organe étudié, les modalités de stockage sont variables. Ces résultats doivent être considérés avec une certaine prudence, étant donné la forte variabilité existant au sein des groupes. Les caractéristiques individuelles de chacun des animaux jouent un rôle important dans les paramètres de stockage de l'OTA, certains animaux ayant des concentrations en OTA dans les organes supérieures d'un facteur 2 à celle d'autres animaux.

Aucun parallèle n'a été dégagé entre la variabilité interindividuelle concernant le stockage de l'OTA et celle, précédemment observée, concernant la concentration sérique d'OTA : les animaux ayant les plus fortes concentrations sériques en OTA ne sont pas ceux qui stockent le plus d'OTA, ni ceux qui en stockent le moins dans les organes.

3.2.2.2 Métabolisation de l'OTA

3.2.2.2.1 Identification et description des métabolites

Les organes sont le site de la métabolisation de l'OTA en des dérivés hydrophiles, favorisant leur élimination dans les urines ou par la bile.

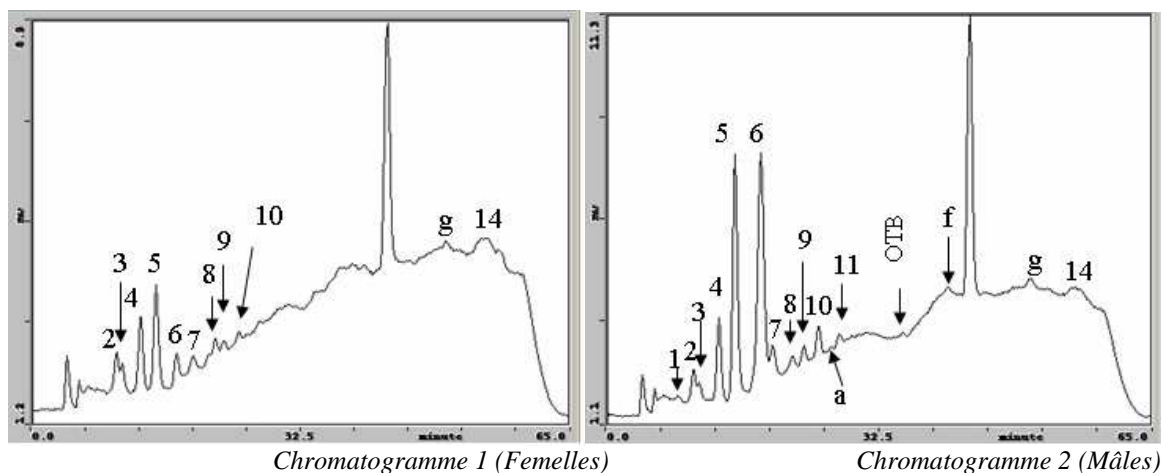
Les extraits obtenus à partir des différents organes ont été analysés à l'HPLC en mode gradient sur le gradient mis au point par Faucet-Marquis (2005).

Différents composés sont visualisés dans les conditions permettant la détection optimale de l'OTA à l'HPLC. La quantité de ces différents composés varie, en fonction de l'organe, et de la dose d'exposition des animaux à l'OTA. Nous avons pris en compte 14 composés, suspectés d'être des métabolites de l'OTA, identifiés par des numéros, de 1 à 14. Treize métabolites correspondent à des formes plus hydrophiles de l'OTA alors qu'un métabolite est une forme plus hydrophobe que l'OTA, caractérisé par un temps de rétention supérieur à celui de l'OTA. Les temps de rétention des métabolites numérotés (ainsi que des métabolites indiqués avec des lettres et l'OTB, que nous avons repérés par la suite dans les urines) sont présentés dans le tableau 21.

Métabolite n°	Temps de rétention (minutes)	Identification
1	8,5	OT β
2	10,6	?
3	11,3	?
4	13,5	?
5	15,5	?
6	18,5	OT α
7	20,5	?
8	21,9	?
9	23,6	?
10	25,5	Dérivé décarboxylé de l'OTHQ (Faucet-Marquis et al, 2006)
a	26,8	?
11	27,9	?
12	30,2	4S-OH OTA
13	32,1	4 R-OH OTA
OTB	33,4	OTB
d	36	OTHQ
f	42,5	Métabolite 17 (Faucet-Marquis, 2005)
OTA	44	OTA
g	46	Métabolite 19 (Faucet-Marquis, 2005)
14	56	OTA méthylée

tableau 21. : temps de rétention et identification des composés détectés à l'HPLC sur le gradient « Faucet ».

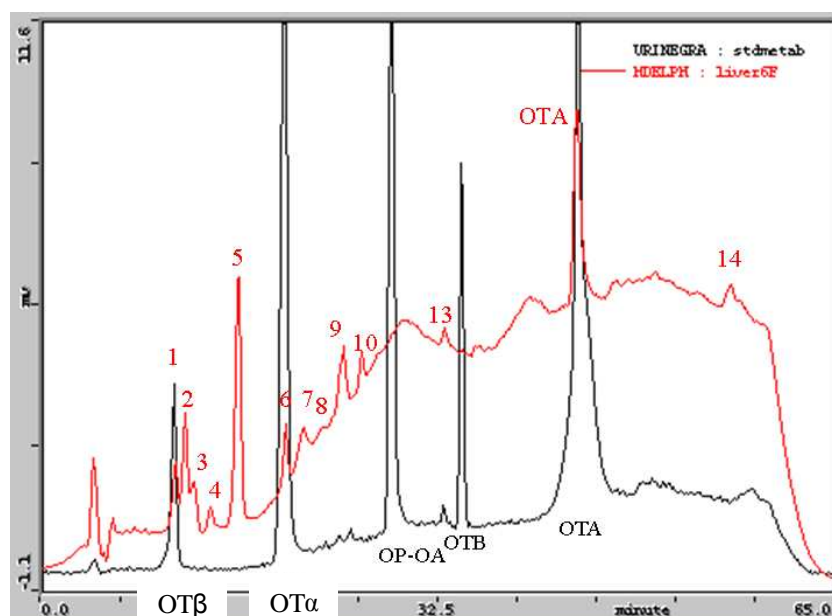
Ces métabolites ont été détectés dans les organes des rats femelles et des rats mâles. Des exemples de chromatogrammes, obtenus lors de l'analyse de certains échantillons de foie de rats mâles et femelles, et sur lesquels certains des métabolites détectés dans l'organe sont numérotés, sont présentés ci-après (Chromatogrammes 1 et 2).



Chromatogrammes 1 et 2 : Séparation des métabolites par HPLC d'un extrait de foie de rat femelle (chromatogramme 1), et mâle (chromatogramme 2) du groupe 5.

On observe sur ces chromatogrammes une dérive de la ligne de base : cette dérive est due à l'enrichissement progressif de la phase mobile en méthanol et acétonitrile, ce qui en modifie les propriétés d'absorbance.

Ce gradient permet une séparation satisfaisante des différents composés présents dans l'échantillon. L'identification de ces métabolites, par comparaison des propriétés chromatographiques, est présentée sur le chromatogramme 3, en prenant pour exemple un extrait de foie de rat femelle



Chromatogramme 3 : Comparaison des caractéristiques chromatographiques d'un extrait de foie de rat femelles avec celle d'un mélange de métabolites identifiés de l'OTA.

Parmi tous les métabolites détectés, seuls quelques uns ont pu être identifiés en se référant à leur temps de rétention. Le métabolite n°1 a les mêmes propriétés chromatographiques que l'OTB (forme de l'OTA ayant perdu le chlore et le groupement phénylalanine). Le métabolite n°6 a un temps de rétention identique à celui de l'Ota (OTA ayant perdu le groupement phénylalanine). Le métabolite

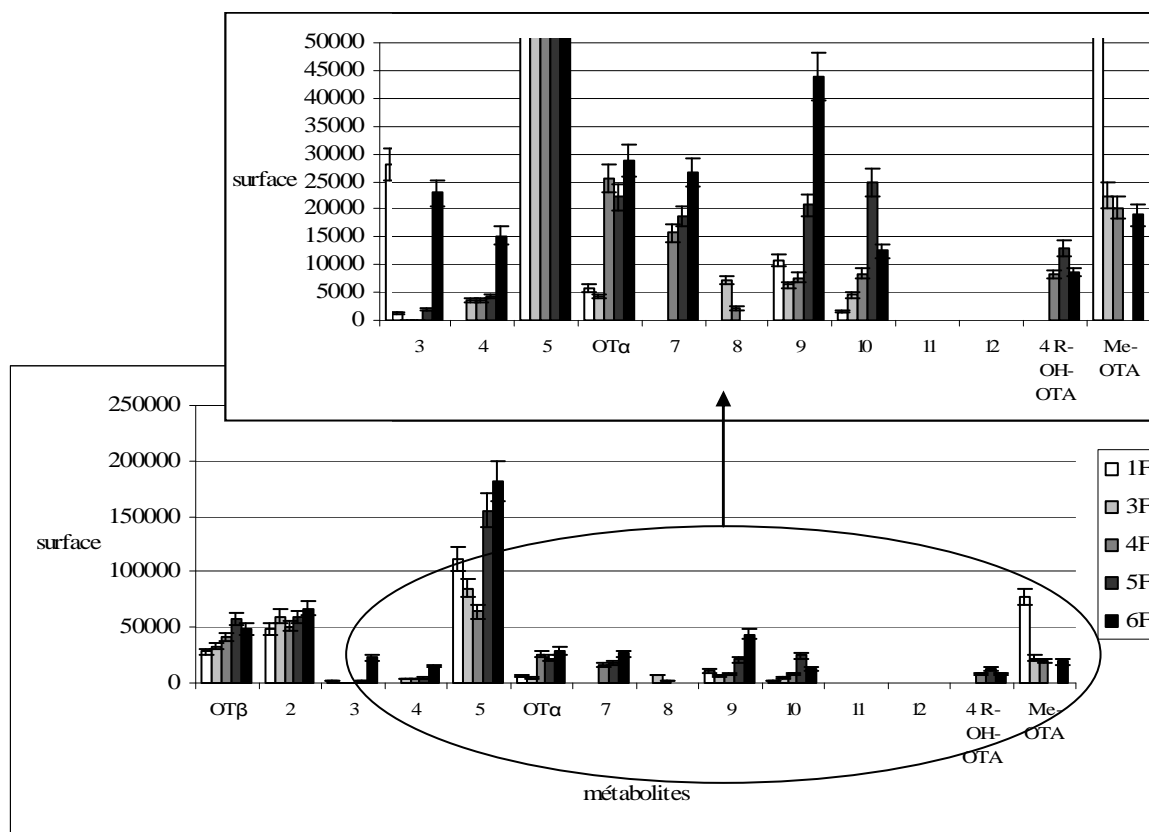
n°10 a les mêmes propriétés chromatographiques que le dérivé décarboxylé de l'OTHQ identifié par Faucet-Marquis *et al* (2006). Le métabolite 12 a un temps de rétention identique à celui de la forme 4 S-hydroxy-OTA. Le métabolite n°13 a un temps de rétention identique à celui de la forme 4 R-hydroxy-OTA. Le métabolite « d » a un temps de rétention identique à celui de la forme OTHQ. Les métabolites f & g ont respectivement les mêmes temps de rétention que les métabolites dénommés 17 et 19, identifiés dans les organes de rats exposés à l'OTA, dans la thèse de Virginie Faucet et dans Faucet-Marquis, *et al* (2006). Le métabolite n°14 a les mêmes propriétés chromatographiques que la forme méthylée de l'OTA. On n'observe ni la forme OP-OTA, ni la 10-OH-OTA. L'OTB a été repérée en quantité non quantifiable, uniquement dans le foie des rats mâles exposés aux plus fortes doses d'OTA, alors que l'OTHQ est observée uniquement dans le rein des rats mâles.

3.2.2.2.2 Métabolisation de l'OTA dans le foie et le rein

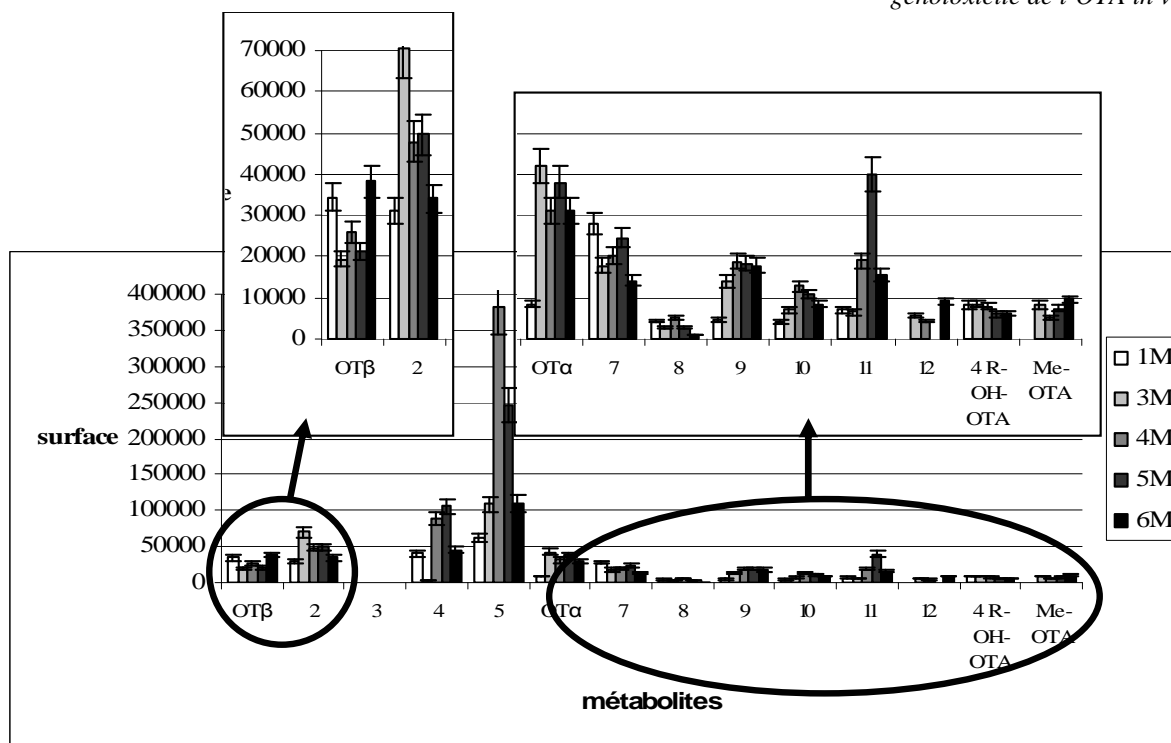
Les métabolites de l'OTA ont été recherchés dans un extrait d'organe constitué à partir d'un pool des organes des différents animaux du même groupe. La quantité relative de chacun de ces métabolites dans les différents organes est présentée sur les graphes ci-après.

3.2.2.2.2.1 Métabolisation au niveau hépatique

Les différents métabolites détectés au niveau hépatique ainsi que leur quantité relative sont présentés dans les graphes 30 et 31.



Graphe 30. : identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le foie des rats femelles.



Graph 31. : identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le foie des rats mâles.

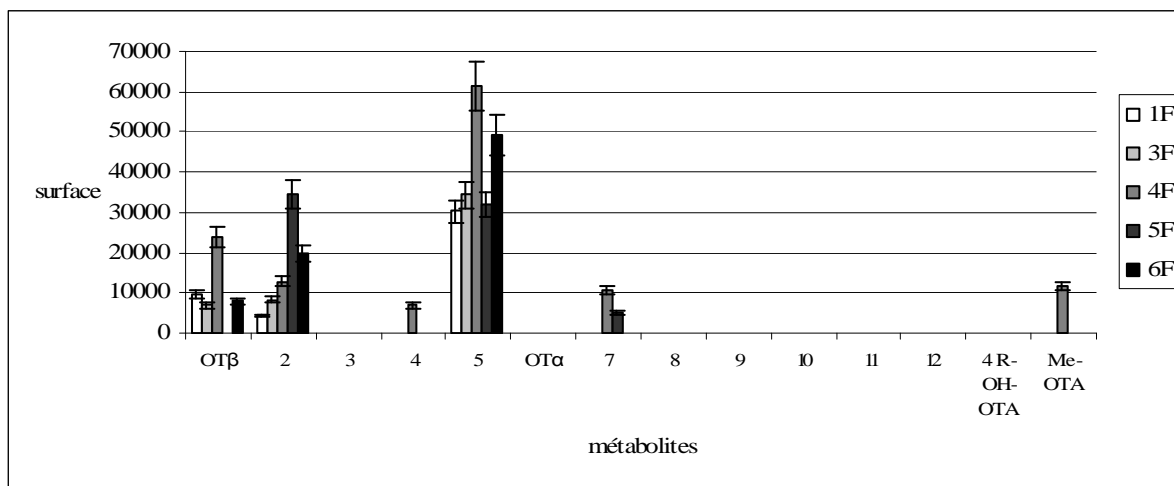
Le foie est un important lieu de la métabolisation aussi bien chez les rats mâles, que chez les femelles. Douze métabolites sont observés et quantifiés chez les rats femelles. Treize métabolites ont été quantifiés chez les rats mâles, auxquels il faut ajouter les métabolites « a », OTB, f et g. Le foie des rats mâles présente quatre métabolites spécifiques : les métabolites « a » (non quantifiable), 11, 12 (4 S-OH-OTA), OTB (non quantifiable). Du point de vue quantitatif, parmi les métabolites communs aux deux sexes, l'OTβ, l'OTα, les métabolites 4, et 5, sont formés en plus grande quantité dans le foie des rats mâles (2 à 10 fois supérieure en fonction du métabolite), alors que le métabolite n°2 et la forme méthylée de l'OTA (Me-OTA) sont détectées en plus grande quantité dans le foie des rats femelles. Le métabolite n°5 est le métabolite le plus fortement détecté au niveau hépatique, aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles. Sa structure n'est pas identifiée.

Pour les rats femelles, la quantité de chacun des métabolites détectés augmente avec l'exposition des rats à l'OTA, à l'exception de la forme Me-OTA dont la quantité diminue quand l'exposition augmente.

Chez les rats mâles, on observe un effet « en cloche » pour la production de certains métabolites (n°2, n°4, n°5, n°10, n°11) avec un maximum de métabolisation pour les doses d'exposition intermédiaires à l'OTA (groupes 4 et 5). Chez les rats mâles exposés à un blé artificiellement contaminé en OTA, la production d'OTα, de 4-R-OH-OTA et celle de Me-OTA sont indépendantes du niveau d'exposition des rats.

3.2.2.2.2 Métabolisation au niveau rénal

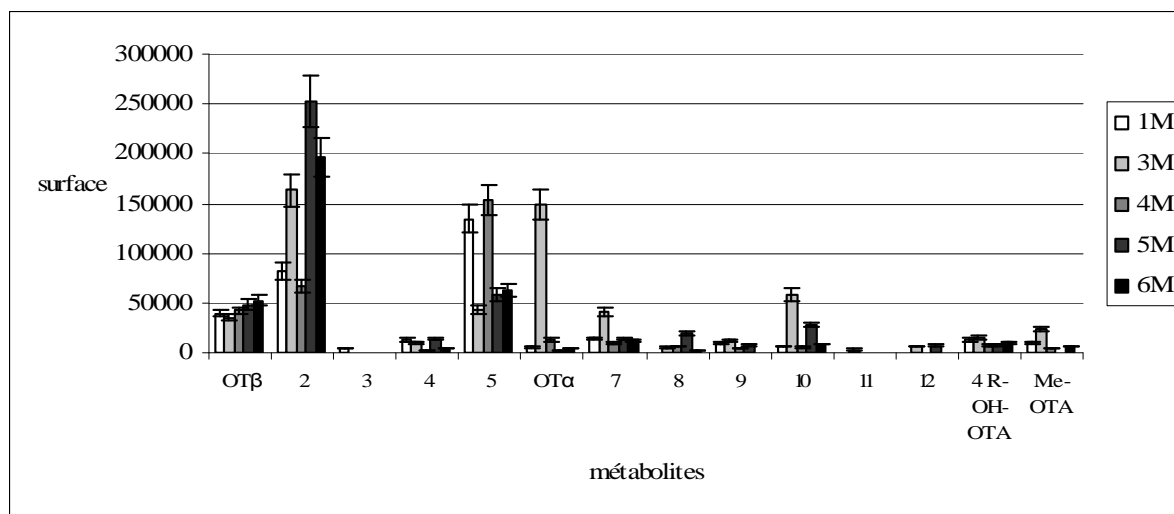
Les résultats obtenus concernant les rats femelles sont présentés sur le graphe 32.



Graph 32. : identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le rein des rats femelles.

Chez les rats femelles, seulement 6 métabolites de l'OTA sont observés. On ne détecte ni d'OT α , ni de 4 R OH-OTA. Le métabolite n°4 et la forme méthylée de l'OTA sont détectés uniquement dans le groupe 4. Les métabolites OT β , 2 et 5, sont présents dans le rein des rats femelles de chacun des groupes, en quantités inférieures à celles détectées au niveau hépatique. L'augmentation de l'exposition des rats se traduit par une augmentation de la métabolisation des métabolites 2 et 5.

Les résultats concernant les rats mâles sont présentés sur le graph 33.



Graph 33. : identification et quantification relative des différents métabolites détectés dans le rein des rats mâles.

Une métabolisation de l'OTA, supérieure à celle des rats femelles, est observée au niveau rénal chez les rats mâles, tant du point de vue qualitatif que quantitatif. On observe la présence de 14 métabolites différents, en plus du métabolite « d » (OTHQ), « f » & « g » (non quantifiés). Les métabolites majoritaires sont les métabolites 2 et 5. Le métabolite n°2 est formé en quantité nettement plus importante (d'un facteur 4) dans le rein, par rapport à ce détecté dans le foie des rats mâles.

D'un point de vue quantitatif, la quantité de métabolites présents dans le rein des rats mâles est supérieure à celle des métabolites présents dans le rein des rats femelles ; on détecte respectivement près de 10 fois et près de 4 fois plus des métabolites n°2 et n°5 chez les mâles.

3.2.2.2.2.6 Résumé

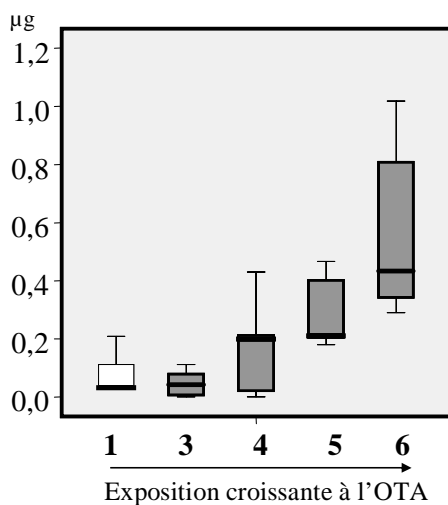
En résumé, la répartition des métabolites de l'OTA dépend de l'organe et du sexe des animaux. La métabolisation de l'OTA a principalement lieu au niveau du rein et du foie des animaux ; néanmoins, les métabolites sont observés dans les autres organes, bien qu'en plus faible quantité (non présenté ici). Une attention particulière devrait être portée aux métabolites n°2 et 5 qui sont souvent majoritaires, et qui sont formés en quantité nettement différente, au niveau hépatique et rénal, chez les rats mâles et les femelles. D'autre part, il faudrait affiner l'analyse dans la zone d'élution des métabolites OP-OTA, OTB et OTHQ, métabolites connus pour leur potentiel toxique et génotoxique. Ces deux derniers métabolites sont retrouvés uniquement chez les rats mâles, respectivement au niveau de leur foie et de leur rein. Seul le mâle forme de la 4S-OH-OTA (métabolite n°12). D'une façon générale, les rats mâles métabolisent plus que les rats femelles, aussi bien au niveau hépatique que rénal. Ceci est d'autant plus flagrant au niveau rénal où les différences entre les deux sexes le sont d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Ces différences qualitatives concernant la métabolisation de l'OTA au niveau du rein peuvent expliquer les variations de sensibilité à l'OTA observées en fonction du sexe.

Nous n'avons pas détecté la présence de métabolites de l'OTA dans le sérum des rats des différents groupes. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans le compartiment sanguin, l'OTA est présente à 80% sous sa forme native, non métabolisée (Studer-Rohr *et al*, 2000). Au cours de notre étude, les concentrations plasmatiques en OTA sont inférieures à 80ng/ml. Il est vraisemblable que, si des métabolites sont présents dans le compartiment sanguin des animaux, leur concentration est faible et en dessous du seuil de détection. Ils peuvent aussi avoir déjà disparus pendant les 14h précédant la récupération du sang. En effet, la demi-vie d'élimination des métabolites de l'OTA est plus rapide que celle de l'OTA. Chez les rats Sprague-Dawley, traités à l'OTA par voie intrapéritonéale, la demi-vie d'élimination de l'OTA est estimée à 103 heures \pm 16 heures, alors que celles de l'OP-OA, Ota, OH-OTA, OTB et OTC sont respectivement 50,5 \pm 2,8h ; 9,6 \pm 2,3h ; 6 \pm 0,9h ; 4,2 \pm 1,2h et 0,6 \pm 0,2 heures (Li *et al*, 1997). Leur concentration dans le compartiment sanguin décroît, par conséquent, plus rapidement que celle de l'OTA expliquant le fait que l'on ne les détecte pas.

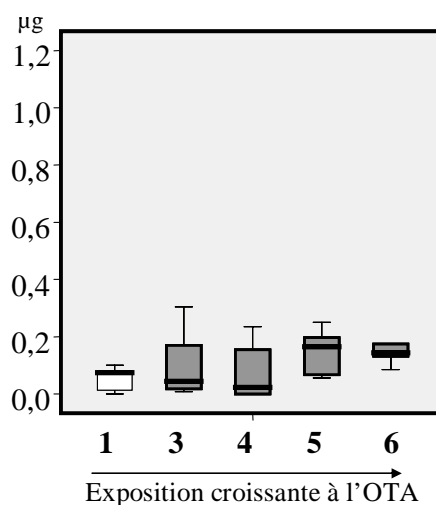
3.2.3 Excrétion urinaire de l'OTA et de ses métabolites

La concentration en OTA dans les urines a été déterminée au cours des 4 semaines de l'expérience. L'excrétion urinaire de l'OTA varie fortement en fonction des individus et en fonction du prélèvement urinaire sur lequel l'OTA est recherchée (cf graphes 58 et 59 ci-contre).

Afin de simplifier l'exploitation des résultats, la quantité cumulée d'OTA excrétée a été déterminée, sur la base des résultats obtenus avec les prélèvements hebdomadaires. Les résultats obtenus sont présentés sur les graphes 34 et 35.



Graphe 34



graphe 35

Graphe 34. quantité d'OTA, en µg, excrétée par la voie urinaire par les rats femelles.

L'excrétion urinaire d'OTA, chez les rats mâles, dépend faiblement de la dose d'exposition des animaux à l'OTA : des quantités d'OTA quasiment équivalentes sont excrétées par les rats mâles, que ceux-ci soient exposés à une dose de 40ng/kg pc/j (groupe 1), de 170ng/kg pc/jour (groupe 3), de 500ng/kg pc/jour (groupe 4), de 3500ng/kg pc/jour (groupe 5) ou de 8500ng/kg pc/jour (groupe 6).

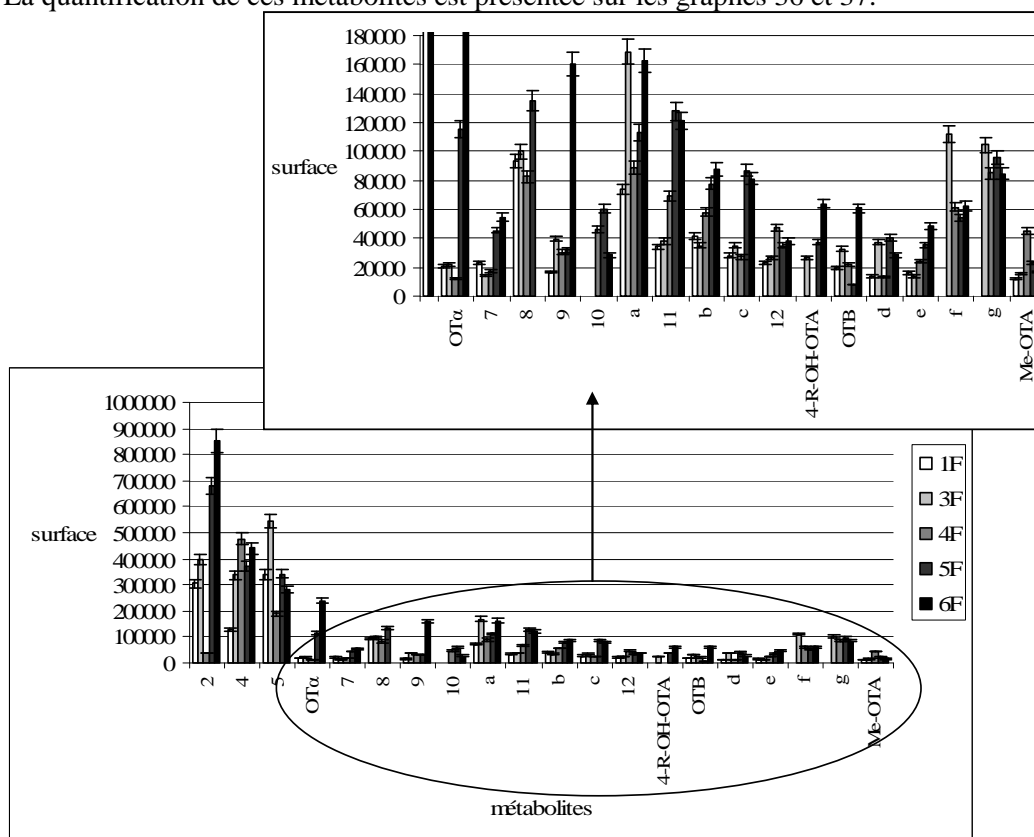
La présence des métabolites de l'OTA a été recherchée dans un mélange des prélèvements urinaires des animaux du même groupe, récupérés au cours de la quatrième semaine d'expérimentation. Les extraits obtenus à partir des urines ont été analysés comme précédemment pour les organes.

Nous détectons 7 métabolites qui étaient faiblement détectés (en dessous du seuil de quantification), ou absents, dans les organes des rats. Ce sont les métabolites « a », « b » (OP-OTA), « c » (10-OH-OTA), « d » (OTHQ), « e », « f » et « g ». Les temps de rétention des différents composés sont ceux décrits dans le tableau 22.

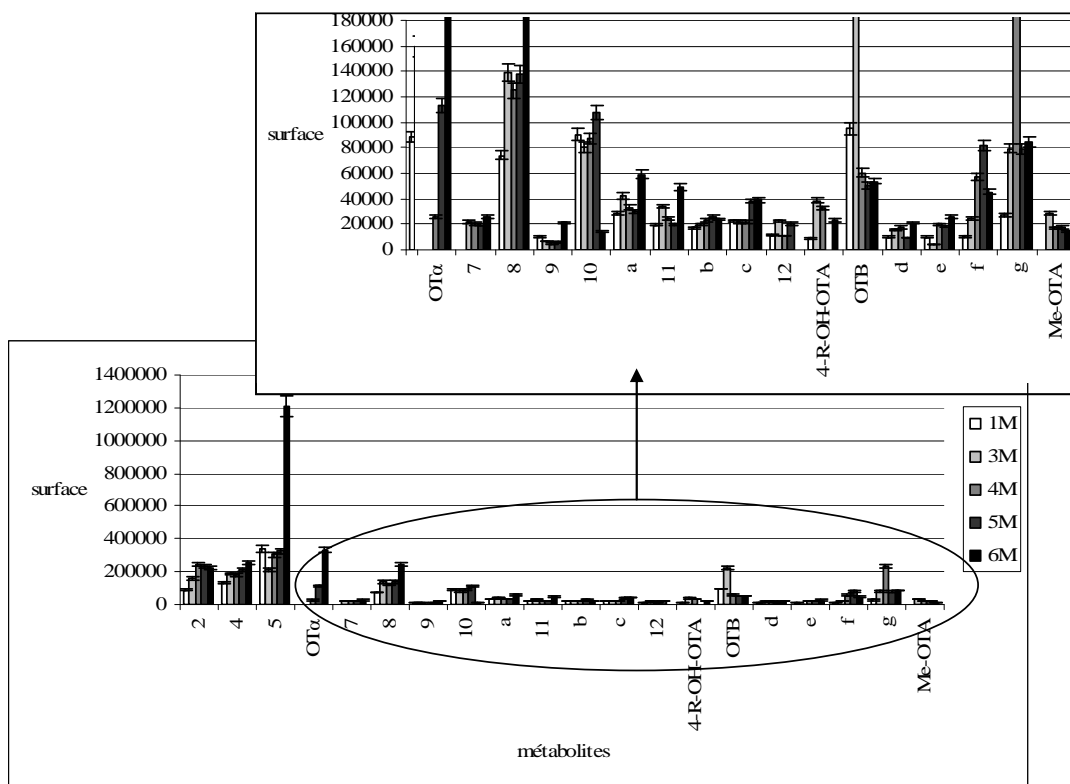
Métabolite ou standard	Temps de rétention (minutes)
OT β	8,5
2	10,2
3	11,3
4	13,8
5	15,5
OT α	18,4
7	20,1
8	21,9
9	23,3
10 (forme décarboxylée de l'OTHQ)	25,4
a	26,8
11	27,9
b (OP-OTA)	28,5
c (10-OH-OTA)	29,6
12 (4-S-OH-OTA)	30,8
4-R-OH-OTA	32,1
OTB	33,4
d (OTHQ ?)	36
e	37,5
f (Métabolite n°17 Faucet-Marquis et al, 2006)	43
OTA	44
g (Métabolite n°19 Faucet-Marquis et al, 2006)	46
Me-OTA	56

tableau 22. temps de rétention et identification des composés détectés à l'HPLC sur le gradient « Faucet ».

La quantification de ces métabolites est présentée sur les graphes 36 et 37.



Graph 36. : quantité, déterminée en fonction de la surface du pic à l'HPLC, des différents métabolites présents dans les urines des rats femelles de la semaine 4.



Graph 37. : quantité, déterminée en fonction de la surface du pic à l'HPLC, des différents métabolites présents dans les urines des rats mâles de la semaine 4.

Vingt métabolites différents sont détectés dans les urines des rats exposés à l'OTA. On note que le métabolite n°3, faiblement présent dans les organes des rats, n'est pas détecté dans les urines. L'OT α , la forme décarboxylée de l'OTHQ (métabolite n°10), l'OP-OTA (métabolite « b »), la 4-S-OH-OTA, la 4-R-OH-OTA, la 10-OH-OTA, l'OP-OTA, l'OTB et l'OTA méthylée sont présents dans les urines des rats mâles et femelles. D'une façon générale, des quantités croissantes de ces métabolites sont excrétées quand l'exposition à l'OTA augmente.

Des quantités supérieures en métabolite n° 2, 4, 7, 9, a, 11, b (OP-OTA), 12, c (10-OH-OTA), d (OTHQ), e, et f, sont excrétées par les rats femelles par rapport aux rats mâles. A l'inverse, les rats mâles excrètent plus des métabolites n° 5, 8, 10 et OTB. En ce qui concerne les autres métabolites de l'OTA, Ota, 4-R-OH-OTA et Me-OTA, les quantités excrétées sont similaires entre les mâles et les femelles.

3.3 Potentiel toxique de l'OTA

3.3.1 Toxicité générale : suivi des paramètres biologiques et physiologiques

3.3.1.1 Evolution pondérale des rats

3.3.1.1.1 Gain de poids des animaux

L'évolution pondérale des rats a été suivie au cours des 28 jours de traitement. Le poids des rats au début de la période d'acclimatation, au premier jour de l'exposition à l'OTA, après 28 jours de traitement à l'OTA ainsi que le gain de poids des animaux pendant la période de traitement sont rapportés dans les tableaux 23 et 24.

Exposition à l'OTA croissante ↓	rats femelles	Poids 12 jours avant le début du traitement (g)	Poids au jour 1 (g)	Poids au jour 28 (g)	Gain de poids en 28 jours (g)
	groupe 1F	77 +/-9,9	102 +/-4,4	117 +/-4,1	15 +/-3,1
	groupe 3F	78 +/-10,8	102 +/-9	117 +/- 9,1	15 +/-3,3
	groupe 4F	78 +/-10	102 +/-14,6	122 +/- 8,7	20 +/-7,8
	groupe 5F	77 +/-10,2	106 +/-9,4	126 +/-10,6	20 +/-2,4
	groupe 6F	78 +/-11,1	103 +/-7,5	122 +/- 8,2	19 +/-5,1

tableau 23. : poids des rats femelles 12 jours avant le début de l'exposition (période d'acclimatation), au premier jour de l'exposition à l'OTA, 28 jours après le début de l'exposition à l'OTA et gain de poids sur la période de traitement des rats.

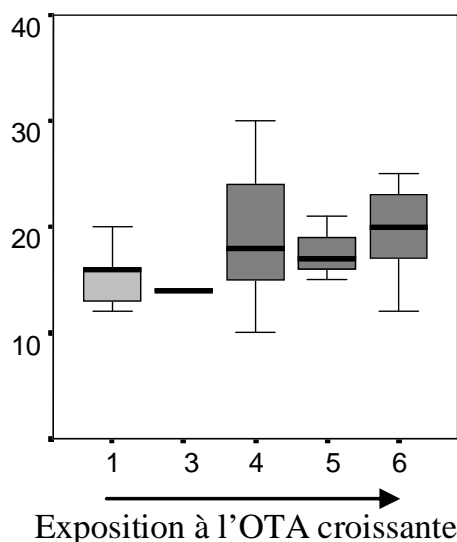
Exposition à l'OTA croissante ↓	rats mâles	Poids 12 jours avant le début du traitement (g)	Poids au jour 1 (g)	Poids au jour 28 (g)	Gain de poids en 28 jours (g)
	groupe 1M	84 +/- 17,3	123 +/-19,3	142 +/- 15,6	25,6 +/-1,5
	groupe 3M	87 +/- 22,5	118 +/-22,2	143 +/-19,8	25 +/- 4,3
	groupe 4M	86 +/- 21,2	123 +/-16,9	150 +/-12,7	27 +/-14,9
	groupe 5M	89 +/- 23,4	124 +/-24	145 +/-20,1	21 +/- 6,8
	groupe 6M	84 +/- 18,2	115 +/-21,2	142 +/-20,3	27 +/-7,6

tableau 24. : poids des rats mâles 12 jours avant le début de l'exposition (période d'acclimatation), au premier jour de l'exposition à l'OTA, 28 jours après le début de l'exposition à l'OTA et gain de poids sur la période de traitement des rats.

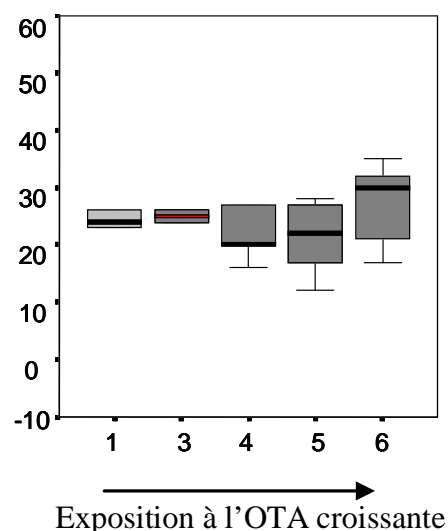
Une très forte hétérogénéité existe concernant le poids des animaux au sein des différents groupes. Dans chaque groupe, on répertorie un animal de faible corpulence et un animal de forte corpulence. Les groupes ont été constitués de façon à ce que ceux-ci soient homogènes entre eux et ce, bien qu'ils soient constitués d'une population hétérogène. L'analyse des valeurs moyennes, obtenues pour chacun des groupes, montre que pour les rats femelles, le gain de poids est légèrement supérieur quand les femelles reçoivent un aliment contaminé en OTA. Les animaux de ces groupes consomment du blé en quantité supérieure à celle des groupes 1 et 3 (10,7 g/jour *versus* 9,9 g/jour en moyenne), ce qui peut expliquer cette différence dans le gain de poids. Cependant, les différences observées ne sont pas significatives étant donnée l'hétérogénéité interne du groupe. Chez les rats mâles, le gain de poids moyen des animaux du groupe 5 (21g) est nettement inférieur à celui des autres groupes de rats (entre 25 et 27g). La différence de gain de poids moyen ne résulte pas d'une consommation en blé réduite : la consommation journalière de blé moyenne des rats mâles du groupe 5 est supérieure ou égale à celle des rats des autres groupes. Cependant, ici aussi, cette différence de gain de poids n'est pas significative considérant la forte hétérogénéité du groupe.

L'analyse par représentation graphique en « boîte à moustache » permet de rendre compte des résultats obtenus pour chaque individu du groupe ; les individus pour lesquels le résultat est aberrant au vu de l'ensemble des groupes est exclu de la boîte.

Le gain de poids des rats des différents groupes est présenté sur les graphes 38 et 39.



Graphe 38



Graphe 39

Graphe 38. : gain de poids au cours des 28 jours de traitement chez les rats femelles exprimé en gramme.

Graphe 39. gain de poids au cours des 28 jours de traitement chez les rats mâles.

Cette analyse confirme qu'aucune différence significative concernant le gain de poids des animaux n'est observée, et ce, bien que les valeurs moyennes, présentées dans le tableau précédent, soient modifiées. Les variations observées en ce qui concerne les valeurs moyennes sont dues à la présence dans les groupes, d'individus ayant des valeurs « extrêmes » par rapport au reste du groupe : dans le groupe 4, un rat mâle a gagné 53 grammes en 28 jours, et dans le groupe 1, un rat mâle a perdu du poids au cours de ces 28 jours de traitement. Ces résultats, éloignés de ceux du reste du groupe, conduisent à des moyennes ne reflétant pas les valeurs de l'ensemble du groupe.

Pour la suite des analyses, nous avons choisi de représenter tous les résultats obtenus sous forme de boîte à moustache

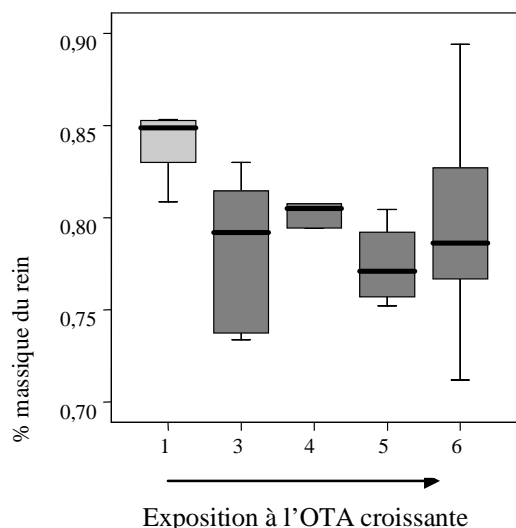
3.3.1.1.2 Poids des organes

Le poids relatif des organes des animaux a été déterminé. Il s'agit pour chaque organe de déterminer le % massique que celui-ci représente par rapport à la masse totale corporelle. Ceci permet de s'affranchir en partie des différences liées aux variations de poids entre les rats de chaque groupe.

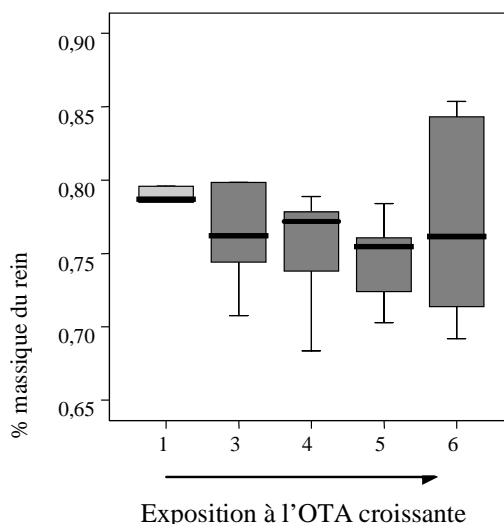
Le poids relatif du rein, du foie, du thymus, des poumons, des ovaires, des testicules et du cœur a été déterminé.

3.3.1.1.2.1 Poids relatif des reins

Le poids relatif des reins des rats mâles et femelles des différents groupes est présenté sur les graphes 40 et 41.



Graph 40



Graph 41

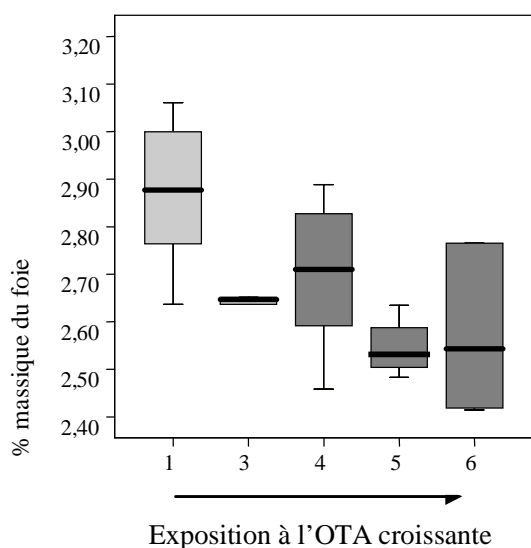
Graph 40. poids relatif des reins des rats femelles exprimé en % par rapport au poids corporel total

Graph 41. : poids relatif des reins des rats mâles exprimé en % par rapport au poids corporel total

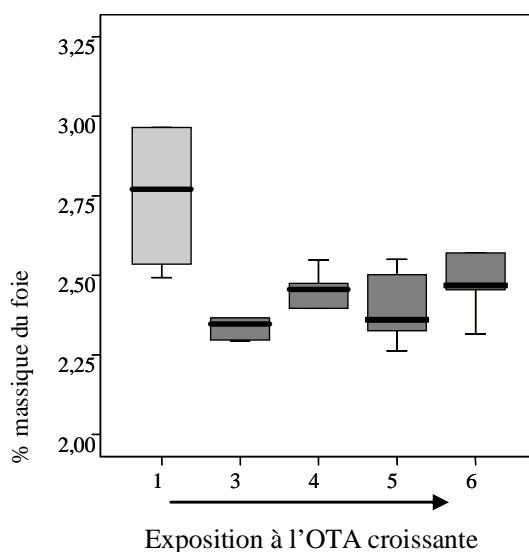
La valeur médiane du poids du rein est diminuée chez les rats femelles recevant un lot de blé artificiellement contaminé en OTA, par rapport à celle du groupe 1. Bien que les différences observées ne soient pas statistiquement significatives, 100% des individus des groupes 3, 4 et 5, ont un poids rénal inférieur à celui des trois quart de la population du groupe 1. Chez les rats mâles, la réduction du poids relatif du rein est moins visible, bien que l'on note que la valeur médiane des groupes recevant une alimentation artificiellement contaminée en OTA est systématiquement inférieure à celle du groupe 1.

3.3.1.1.2 Poids relatif du foie

Les résultats concernant le poids relatif du foie des rats femelles et des rats mâles sont présentés sur les graphes 42 et 43.



Graph 42



Graph 43

Graph 42. : poids relatif du foie des rats femelles en % par rapport au poids corporel total

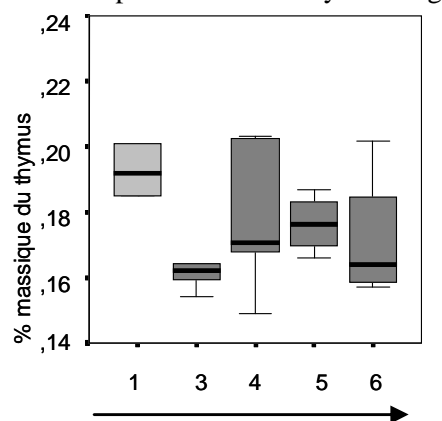
Graphe 43. : poids relatif du foie des rats mâles en % par rapport au poids corporel total

La valeur médiane du poids relatif du foie des groupes de rats recevant un aliment artificiellement contaminé en OTA est inférieure à celle du groupe de référence. Cette baisse est significative chez le mâle dès la plus faible exposition *via* un blé sur-contaminé en OTA (2,5 µg OTA/kg de blé). Pour les doses d'exposition plus élevées, la baisse du poids relatif du foie, chez les rats mâles, n'est pas plus prononcée.

Pour les femelles, la baisse du poids relatif du foie dépend de la dose, celle-ci s'accroissant quand l'exposition des rats augmente. Une réduction significative est observée au sein du groupe de rats femelles n°5.

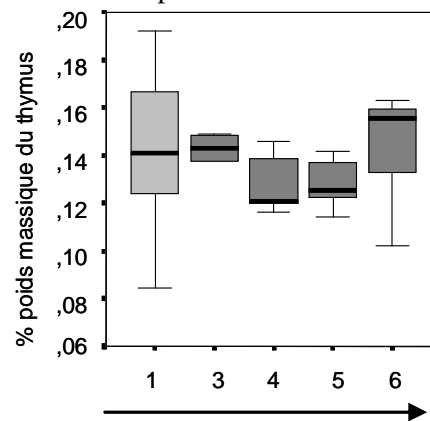
3.3.1.1.2.3 Poids relatif du thymus

Le poids relatif du thymus a également été étudié. Les résultats sont présentés ci-dessous.



Exposition à l'OTA croissante

Graphe 44



Exposition à l'OTA croissante

Graphe 45

Graphe 44. Poids relatif du thymus, exprimé en % massique du poids corporel total, chez les rats femelles.

Graphe 45. Poids relatif du thymus, exprimé en % massique du poids corporel total, chez les rats mâles.

La comparaison des valeurs médianes des différents groupes de rats montre une tendance à la régression du poids relatif du thymus pour les rats femelles exposés à des lots de blé artificiellement contaminés en OTA. Pour les rats mâles, aucune régression thymique n'est observée.

3.3.1.1.2.4 Poids relatif des poumons, des testicules, des ovaires, du cœur et du cerveau

Aucune différence significative, en relation avec l'exposition des rats à l'OTA, n'est observée concernant le poids relatif des poumons, des testicules, des ovaires, du cœur ou du cerveau en fonction de l'exposition des rats à l'OTA.

3.3.1.1.3 Conclusions

Nous avons résumé les résultats obtenus dans le tableau 25.

sexe	Groupes de rats femelles					Groupes de rats mâles				
N° de groupe	1	3	4	5	6	1	3	4	5	6
Poids total	réf	=	=	=	=	réf	=	=	=	=
Gain de poids en 28 jours	réf	=	=	=	=	réf	=	=	=	=
Poids relatif des reins	réf	~	-	-	~	réf	~	~	~	~
Poids relatif du foie	réf	~	-	-	~	réf	-	-	-	-
Poids relatif du thymus	réf	-	=	~	~	réf	=	=	=	=
Poids relatif des poumons	réf	~	=	~	=	réf	=	=	-	=
Poids relatif des gonades	réf	=	=	=	+	réf	=	=	=	=
Poids relatif du cœur	réf	=	=	=	=	réf	=	=	=	=
Poids relatif du cerveau	réf	=	=	=	=	réf	+	=	=	=

Réf : groupe de référence

+ : augmentation par rapport au groupe 1

- : réduction par rapport au groupe 1

~ : Tendence à la baisse (au vu des valeurs médianes)

= : pas de variations du paramètre par rapport au groupe 1

tableau 25. : variations du poids total, du gain de poids ainsi que du poids relatif des différents organes en fonction du sexe et du groupe.

Dans cette étude, nous avons constaté que, ni le poids corporel total, ni le gain de poids des rats ne sont affectés suite à l'exposition de ceux-ci à l'OTA. Au cours d'une autre étude, effectuée au laboratoire sur les rats Dark Agouty, une baisse du gain de poids avait été observée lorsque les animaux étaient exposés pendant trois semaines à 15 µg/kg pc/jour d'OTA. (Molinié, 2004).

Un retard de croissance sur des rats de la race Wistar, suite à l'exposition de ceux-ci à l'OTA *via* l'aliment, avait été mis en évidence pour des doses supérieures à 480µg/kg pc/ jour lors d'un traitement pendant 14 jours (Munro *et al*, 1974). Une étude menée pendant 90 jours sur des rats Wistar, mâles et femelles, a permis d'établir la dose pour laquelle on n'observe aucune réduction du gain de poids à 75µg/kg pc/j. Les doses d'exposition à l'OTA testées dans notre étude, comprises entre 170 ng/kg pc/jour et 8µg/kg pc/jour, sont très largement inférieures à celles testées par Munro *et al* , ce qui explique pourquoi nous n'observons aucune modification.

Quelques variations sont observées concernant le poids relatif des organes. Le poids relatif du rein, organe cible de l'OTA, n'est pas significativement modifié chez les rats mâles, bien qu'une tendance à la baisse soit notée. Chez les rats femelles, on observe une réduction du poids relatif du rein, notamment dans les groupes 4 et 5, exposés aux doses respectives de 0,5 et 3,5 µg d'OTA/kg pc/jour. Une diminution du poids relatif du rein a été observée chez des rats mâles et femelles de la race Wistar, suite à l'exposition de ceux-ci à l'OTA, par l'aliment, pendant 90 jours (entre 16 et 370 µg d'OTA/kg pc/jour). Cet effet n'est plus observé pour des doses d'expositions inférieures ou égales à 16µg/kg pc/jour (Munro *et al*, 1974). Il est intéressant de noter que bien que la dose d'exposition, ainsi que la durée du traitement, soient plus faibles que celles testées dans la littérature, l'effet toxique de l'OTA peut être observé chez les rats femelles, aux doses que nous avons testées.

L'effet d'une exposition à l'OTA est plus prononcé au niveau hépatique, où une réduction du poids relatif est visible chez les rats mâles et femelles.

Pour les rats femelles, on note également une tendance à une diminution de la masse du thymus ; cet effet a été observé chez des poulets exposés à des doses d'OTA comprises entre 0,5 et 2 mg/kg pc pendant 21 jours (Singh *et al*, 1990) ainsi que chez des rats de la race Fischer recevant l'OTA par gavage (1 à 4mg/kg pc/jour pendant 16 jours) (NTP, National Toxicology Program, 1989).

En ce qui concerne le poids relatif des autres organes (cerveau, organes sexuels et poumons), les variations observées sont ponctuelles, ne concernent qu'un groupe de rats mâles ou femelles, et peuvent par conséquent difficilement être mises en relation avec l'exposition à l'OTA. Cependant, des augmentations du poids relatif du cerveau ainsi qu'une atrophie du thymus ont été observées suite à l'exposition de rats de la race Fischer à de l'OTA par gavage (4 et 16mg/kg pc/jour pendant 16 jours, à raison d'une dose 5 jours sur 7 jours) (NTP, 1989). Au cours de notre étude, une atrophie thymique est observée chez les femelles du groupe 3, et une augmentation du poids relatif du cerveau est visualisée chez les rats mâles de ce même groupe. Curieusement aucun effet n'est observé dans les autres groupes de rats mâles et femelles.

3.3.1.2 Hématologie et Biochimie du sang

3.3.1.2.1 Hématologie

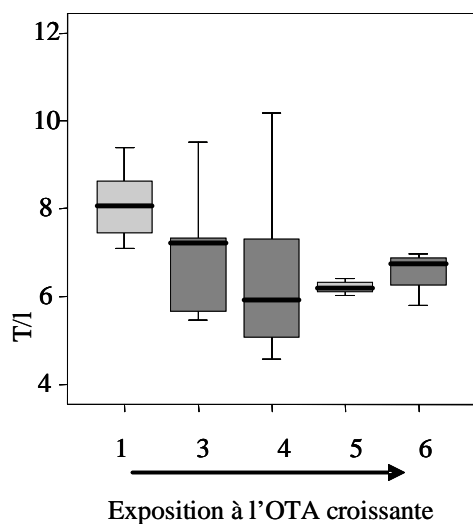
La numération des éléments sanguins, ou hémogramme, est un examen essentiel qui apporte des renseignements sur les cellules sanguines, sur les processus de défense immunitaire, sur l'hémostase (phénomène de coagulation).

Les paramètres hématologiques suivants ont été déterminés, sur le sang des rats à la fin de la période de traitement :

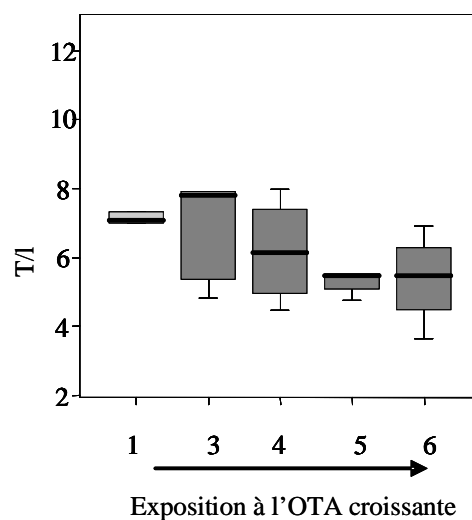
- concentration en leucocytes (concentration en neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes et lymphocytes)
- concentration en érythrocytes,
- concentration en thrombocytes,
- concentration en fibrinogène
- temps d'activation plaquettaire.

3.3.1.2.1.1 Taux leucocytaire sanguin

Les résultats obtenus concernant la concentration en leucocytes sont présentés ci-dessous, sur les graphes 46 et 47.



Graphe46



Graphe 47

Graphe 46. : concentration en leucocytes dans le sang des rats femelles des différents groupes, exprimé en g/l de sang.

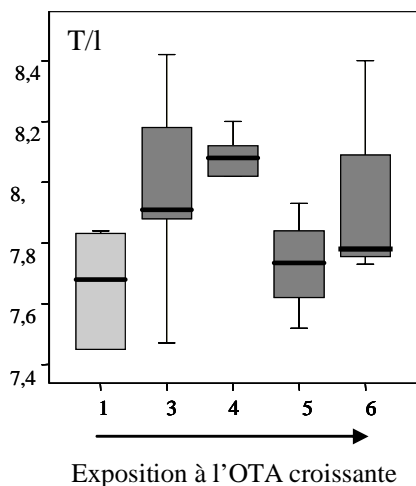
Graphe 47. : concentration en leucocytes dans le sang des rats mâles des différents groupes, exprimé en g/l de sang.

On observe, aussi bien chez les mâles que chez les femelles une diminution du taux leucocytaire sanguin. La concentration en leucocyte est significativement réduite chez les rats femelles et mâles des groupes 5 et 6 recevant les lots de blé les plus contaminés (40 et 100µg d'OTA/kg). Cette diminution du taux leucocytaire est liée à la diminution de la quantité de lymphocytes présents dans le sang, mais également à celle des monocytes sanguins, nettement réduite chez les rats femelles des groupes 5 et 6 (cf graphes 81 à 84 ci-contre).

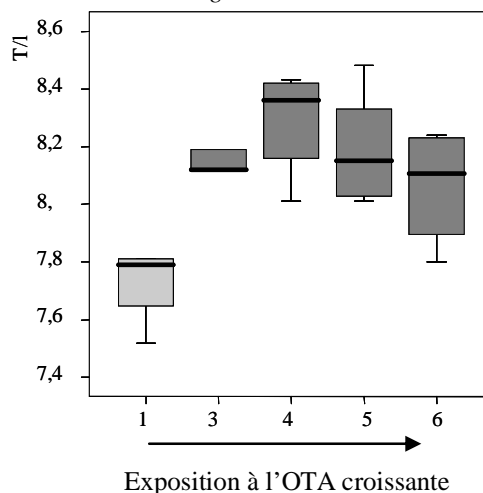
Une baisse du taux de globules blancs peut être le résultat d'une atteinte du système immunitaire.

3.3.1.2.1.2 Taux érythrocytaire

Les résultats concernant le taux sanguin en globules rouges sont présentés sur les graphes 48 et 49.



Graphe 48



Graphe 49

Graphe 48. concentration sanguine en érythrocytes chez les rats femelles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.

Graphe 49. concentration sanguine en érythrocytes chez les rats mâles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.

Pour les rats mâles exposés à des lots de blé artificiellement contaminés en OTA, la concentration sanguine en érythrocytes est significativement accrue. On note un effet « en cloche » avec l'effet le plus prononcé pour les rats du groupe 4, exposés à une dose intermédiaire en OTA (500ng/kg pc/jour). Pour les rats femelles, l'augmentation de la concentration érythrocytaire est significative uniquement au sein de ce groupe 4 recevant le lot de blé contaminé à 7µg/kg d'OTA. Etant donnée la forte hétérogénéité, l'effet « en cloche » est moins visible chez les rats femelles que chez les mâles.

Une augmentation du taux d'érythrocytes est un phénomène peu courant qui est observé sous l'effet d'un stress oxydatif. Cet effet, chez les rats mâles, peut être mis en parallèle avec la capacité de l'OTA à induire un stress oxydatif (Rahimtula *et al*, 1988).

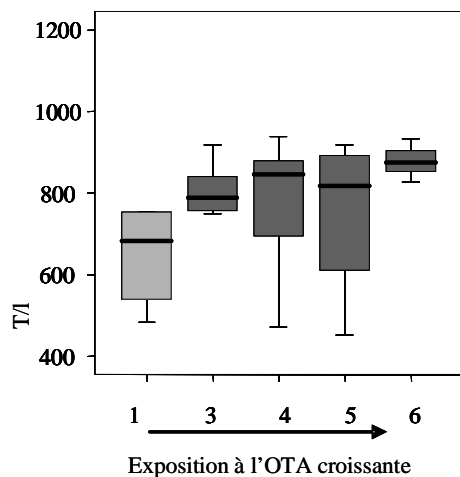
3.3.1.2.1.3 Facteurs de la coagulation

Les paramètres conditionnant la coagulation sanguine, tels que la concentration plaquettaire, la concentration en fibrinogène, ou la détermination du temps d'agrégation plaquettaire ont été déterminés.

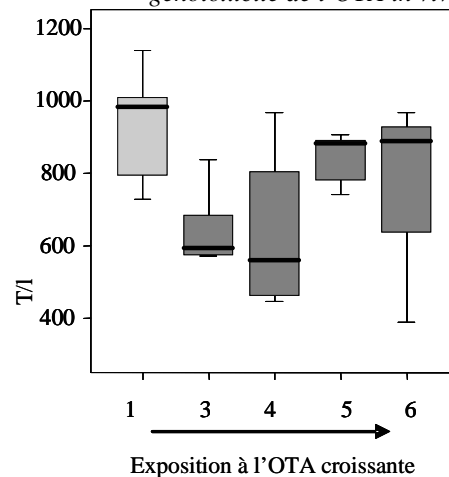
- **Concentration plaquettaire**

Une augmentation des plaquettes définit une thrombocytose, souvent observée au cours de processus inflammatoires ; une baisse des plaquettes (thrombopénie) traduit un risque hémorragique.

Les résultats, concernant la concentration sanguine en plaquettes, sont présentés sur les graphes 50 et 51.



Graphe 50



Graphe 51

Graphe 50. concentration plaquettaire dans le sang de rats femelles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.

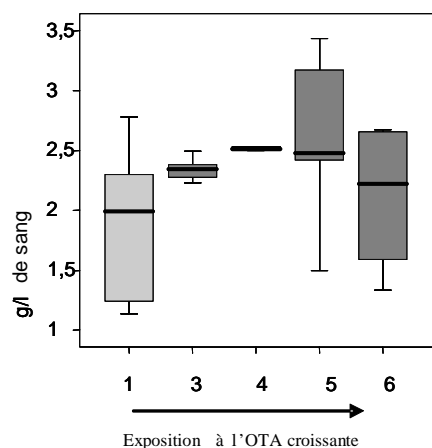
Graphe 51. concentration plaquettaire dans le sang de rats mâles des différents groupes, exprimé en nombre de cellules/l.

Chez les femelles, les valeurs médianes de la concentration plaquettaire sont augmentées dans tous les groupes de rats recevant un lot de blé artificiellement contaminé en OTA. La concentration plaquettaire est significativement supérieure, à celle du groupe de référence, dans les groupes 3 et 6.

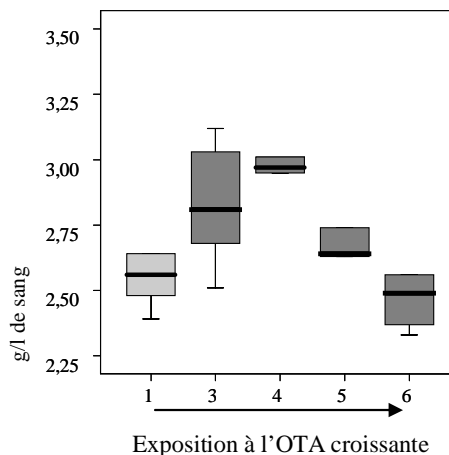
Considérant l'importante variabilité de ce paramètre chez les rats mâles, on peut considérer que la concentration plaquettaire n'est pas significativement modifiée chez les rats mâles des différents groupes, bien que les valeurs médianes des groupes 3 et 4 soient nettement diminuées.

• Concentration en fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine fabriquée par le foie, qui, en cas d'activation de la coagulation, est transformée dans le sang en fibrine, principale protéine constitutive du caillot sanguin. Son dosage est utilisé dans l'exploration des processus inflammatoires et des troubles de la coagulation sanguine. Une augmentation du taux de fibrinogène sanguin traduit un état inflammatoire. Une baisse du taux de fibrinogène sanguin s'observe en cas d'insuffisance hépatique. La concentration sanguine en fibrinogène, pour les rats femelles et mâles, est présentée sur les graphes 52 et 53.



Graphe 52



Graphe 53

Graphe 52. Concentration en fibrinogène, en g/l, dans le sang des rats femelles

Graphe 53. Concentration en fibrinogène, en g/l, dans le sang des rats mâles

La concentration en fibrinogène, dans le compartiment sanguin, est variable, en fonction du niveau de contamination en OTA du blé reçu par les rats. Un effet « en cloche », en fonction de l'exposition à l'OTA, est observé concernant la concentration en fibrinogène pour les rats mâles. On observe une augmentation significative de la concentration sanguine en fibrinogène dans les groupes 4 et 5 des rats mâles, recevant respectivement un aliment contaminé à 7 et 40 µg d'OTA/kg de blé. Pour la dose intermédiaire d'exposition (40 µg OTA/kg blé), on note seulement une tendance à la hausse chez les rats femelles. Pour le groupe exposé à la concentration en OTA la plus élevée (100 µg OTA/kg de blé), on observe une concentration sanguine en fibrinogène similaire à celle du groupe 1, groupe recevant un blé non artificiellement contaminé en OTA, pour les rats femelles et mâles. Ceci indique que de faibles expositions à l'OTA activent le processus d'inflammation.

3.3.1.2.2 Biochimie sanguine

Le bon fonctionnement des organes vitaux, comme le foie et le rein, peut être apprécié par la mesure de certains facteurs biochimiques du sang. Le bilan rénal comprend un ionogramme sanguin (mesure des électrolytes : sodium, chlore, potassium, bicarbonate, phosphore inorganique, calcium), la détermination de la concentration en urée et en créatinine plasmatiques. Le bilan hépatique comprend le dosage de plusieurs enzymes dans le sang, relativement spécifique du foie et fabriquées (au moins en partie) par le foie : les transaminases (ASAT, ALAT), la phosphatase alcaline (ALP), la gamma glutamyltranspeptidase (GGT). D'autres dosages sanguins, tels que ceux du cholestérol, du fibrinogène, et de l'albumine, reflètent moins spécifiquement l'activité du foie mais sont néanmoins des marqueurs du métabolisme hépatique.

Les paramètres suivants ont été analysés :

- chlore (Cl^-),
- sodium (Na^+),
- potassium (K^+),
- calcium (Ca^{2+}),
- phosphore inorganique (I. Phosp),
- glucose,
- urée,
- créatinine,
- cholestérol,
- triglycérides,
- phosphatase alcaline (ALP),
- aspartate aminotransférase (ASAT),
- alanine aminotransférase (ALAT).

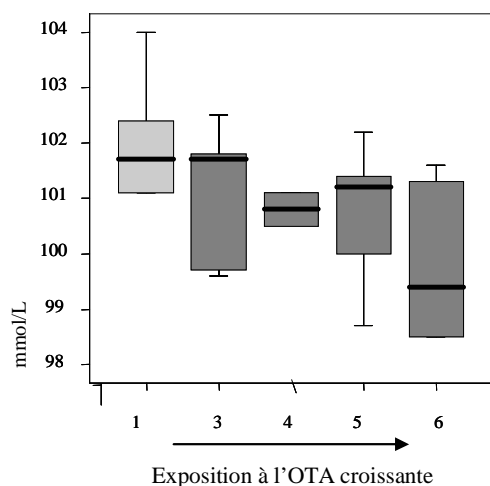
3.3.1.2.2.1 Concentration sanguine en électrolytes

L'étude de la concentration plasmatique en ions sodium (Na^+), potassium (K^+), chlore (Cl^-) et bicarbonates (CO_3^-), renseigne sur l'équilibre hydro-électrolytique de l'organisme, c'est-à-dire l'équilibre entre les différents ions dans le plasma. Cet équilibre est physiologiquement assuré par le rein, mais aussi par la peau, la respiration et le système digestif.

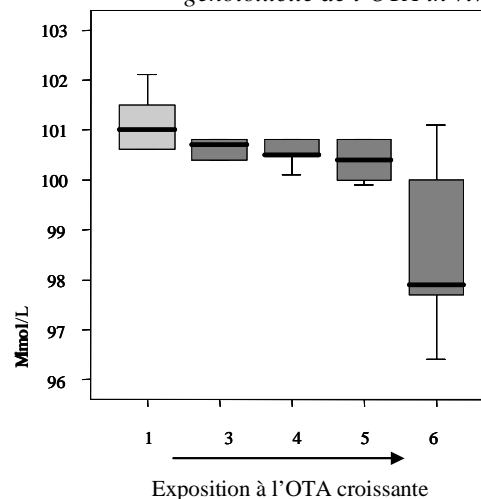
• Concentration en Cl^-

Les variations de la concentration en Cl^- sont habituellement parallèles à celles du sodium. Il est aussi en relation avec le bicarbonate, puisqu'une élévation du taux de chlore dans le sang peut être liée à une perte excessive de bicarbonate dans les urines. Une baisse du taux de chlore dans le sang est souvent le reflet d'une insuffisance rénale, avec perte excessive de sels ou d'un mauvais fonctionnement de l'hormone antidiurétique, et/ou d'une insuffisance hépatique.

Les résultats concernant la concentration en Cl^- sont présentés sur les graphes 54 et 55.



Graphe 54



Graphe 55

Graphe 54. concentration en Cl^- , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats femelles des différents groupes.

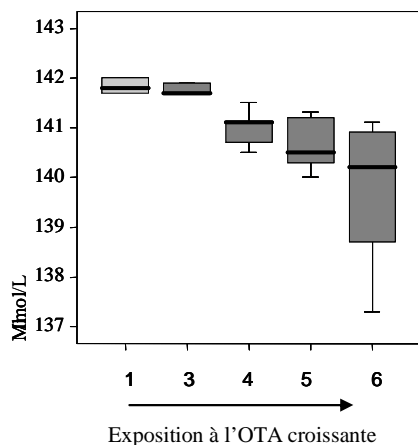
Graphe 55. concentration en Cl^- , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats mâles des différents groupes.

La concentration en Cl^- dans le sang des rats femelles et des rats mâles n'est pas significativement modifiée. Néanmoins, on observe une tendance à une diminution de cette concentration, en fonction de l'exposition des rats à l'OTA. Les valeurs médianes des groupes de rats recevant des lots de blé artificiellement contaminés en OTA, sont inférieures à celle du groupe de référence, cet effet étant d'autant plus marqué que l'exposition des rats à l'OTA est élevée. Pour les rats mâles du groupe 6, la diminution est significative par rapport au groupe 1.

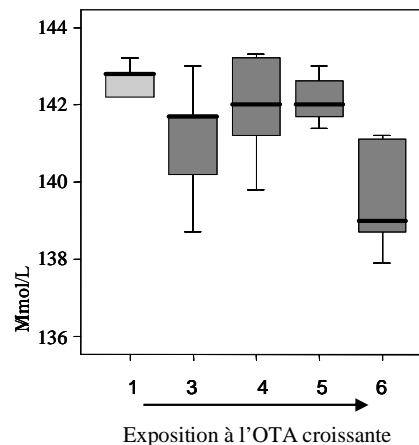
• Concentration en Na^+

L'ion sodium (Na^+) est très important dans le maintien de l'hydratation d'un organisme. Il représente l'essentiel des cations du milieu extra-cellulaire. La natrémie représente schématiquement le rapport entre la quantité de sel et la quantité d'eau présente dans l'organisme. On note une baisse du taux de sodium sanguin lors d'une insuffisance rénale avec perte importante de sels ou lors d'un mauvais fonctionnement de l'hormone anti-diurétique.

Les résultats concernant la concentration en Na^+ sont présentés sur les graphes 56 et 57



Graphe 56



Graphe 57

Graphe 56. concentration en Na^+ , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats femelles

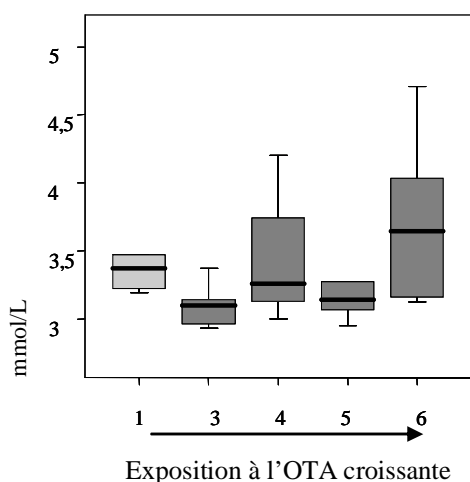
Graphe 57. : concentration en Na^+ , exprimé en mmol/l, dans le sang des rats mâles

La concentration en Na^+ diminue significativement pour les rats femelles. La baisse est fonction de la dose d'exposition : plus l'exposition à l'OTA est élevée, plus la baisse est importante. Pour les rats mâles, cet effet est moins progressif. La réduction de la concentration en Na^+ , dans le sang des mâles, est significative au sein du groupe de rats recevant le lot de blé contaminé au plus fort taux d'OTA (100 $\mu\text{g/kg}$ de blé). Ceci indique que les doses d'exposition les plus élevées testées dans notre étude induisent déjà une dérégulation de la fonction rénale.

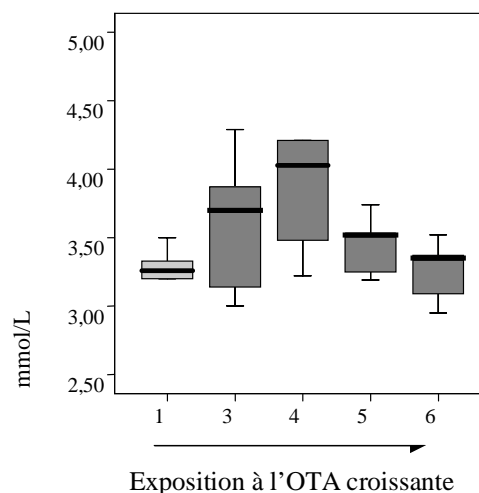
- **Concentration en K^+**

L'ion potassium (K^+) est très important dans l'organisme. Il représente le principal cation du milieu intra-cellulaire. Des anomalies de la concentration en K^+ sont fréquemment à l'origine de troubles cardio-vasculaires. Il y a hypokaliémie lors d'acidose au niveau des tubules rénaux et hyperkaliémie lors d'insuffisance rénale importante.

Les résultats concernant la concentration en K^+ sont présentés sur les graphes 58 et 59.



Grappe 58



Grappe 59

Grappe 58. concentration en K^+ , en mmol/l, dans le sang des rats femelles

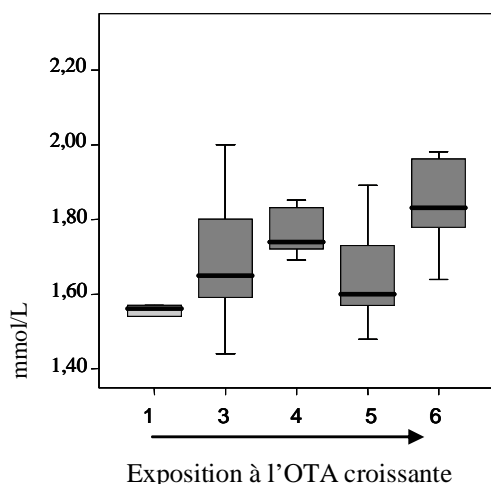
Grappe 59. concentration en K^+ , en mmol/l, dans le sang des rats mâles

La concentration en K^+ ne varie pas de façon significative, que ce soit chez les rats mâles ou femelles. Tout au plus, on observe une tendance à l'augmentation de la concentration en K^+ , chez les rats mâles exposés aux doses intermédiaires d'OTA : on visualise à nouveau un effet « en cloche » en fonction de l'exposition à l'OTA. Cette tendance est à prendre en compte dans le contexte d'une altération de la fonction rénale.

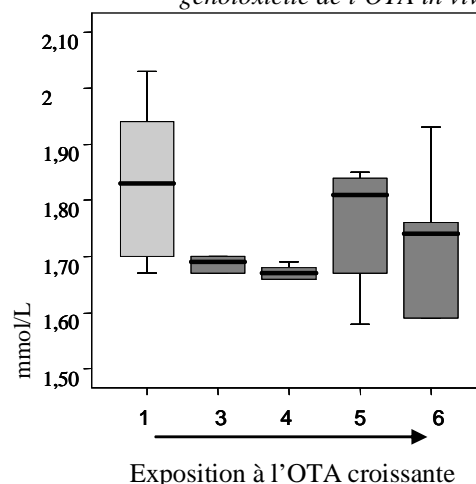
- **Concentration en Ca^{2+}**

Le calcium représente le cation le plus important, en terme de quantité, de l'organisme (entre 1 et 2 kg de calcium chez un adulte), mais seule une petite partie joue un rôle dans l'équilibre cellulaire et la transmission nerveuse. Lors d'insuffisance rénale chronique, ou lors d'hypothyroïdie, la calcémie baisse, alors qu'elle augmente lors d'hyperthyroïdie ou d'atteinte osseuse.

La concentration en Ca^{2+} est présentée sur les graphes 60 et 61.



Graph 60



Graph 61

Graph 60. concentration en Ca^{2+} , en mmol/l, dans le sang des rats femelles des différents groupes.

Graph 61. concentration en Ca^{2+} , en mmol/l, dans le sang des rats mâles des différents groupes.

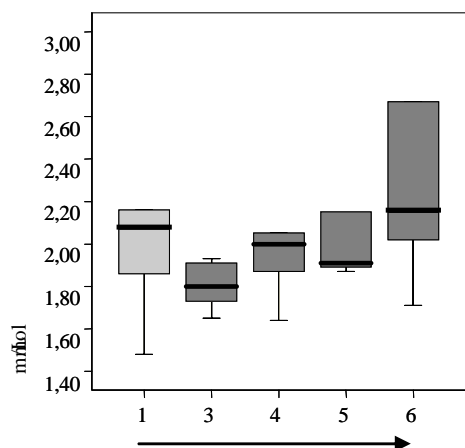
La concentration sanguine en Ca^{2+} augmente chez les femelles en fonction de la dose. Cette augmentation est significative pour les groupes 4 et 6 par rapport au groupe 1. Chez les mâles, aucune variation significative de la concentration en Ca^{2+} n'est observée, à l'exception du groupe 4, pour lequel, une baisse significative est observée. Dans le groupe 3, on observe également une tendance à une réduction de la concentration sanguine en calcium, cependant, celle-ci n'est pas significative du fait de la présence dans ce groupe d'un animal ayant une concentration en Ca^{2+} de 1,92 mmol/l, valeur considérée comme non représentative du reste du groupe par le logiciel statistique, et, éliminée de ce fait de la représentation graphique.

• Concentration en phosphore inorganique

Le phosphore est un élément très important dans l'organisme, non seulement en coopération avec le calcium pour maintenir la structure osseuse, mais aussi pour toutes les cellules de l'organisme, en leur fournissant de l'énergie directement accessible par l'ATP. Le phosphore existe dans le plasma sous sa forme minérale d'acide orthophosphorique (H_3PO_4), et sous la forme de ses différents sels qui sont essentiellement Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 , souvent désignés par phosphore inorganique. C'est ce phosphore que nous avons dosé. Le phosphore organique retrouvé dans les phospholipides, phosphoprotéines, acides nucléiques, adénosine triphosphate (ATP), nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate, 2,3-bisphosphoglycérate etc... n'est pas pris en compte.

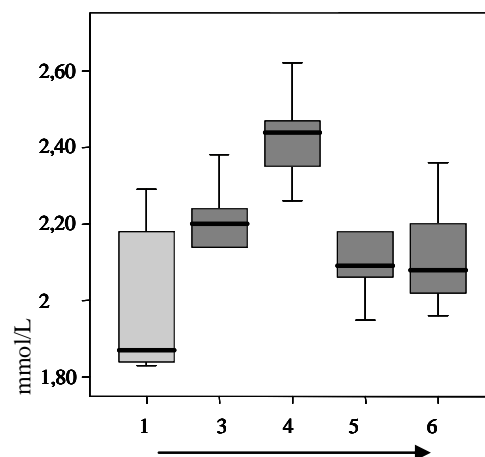
Lors d'insuffisance rénale chronique, le taux de phosphore inorganique dans le sang augmente.

Les résultats concernant la concentration en phosphore inorganique sont présentés sur les graphes 62 et 63.



Exposition à l'OTA croissante

Graph 62



Exposition à l'OTA croissante

Graph 63

Graph 62. concentration en phosphore inorganique, en mmol/l, dans le sang des rats femelles des différents groupes.

Graph 63. concentration en phosphore inorganique, en mmol/l, dans le sang des rats mâles des différents groupes.

La concentration en phosphore inorganique n'est pas significativement modifiée chez les rats femelles. Par contre, celle-ci est significativement augmentée dans le sang des rats mâles du groupe 4, exposés à une dose intermédiaire en OTA (500ng/kg pc/jour). On observe, à nouveau, un effet « en cloche ».

3.3.1.2.2.2 Concentration sanguine en glucose, cholestérol, urée, créatinine et triglycérides

• Concentration en glucose

Le glucose est le principal sucre de l'organisme. C'est lui qui apporte l'énergie à la plupart des cellules. Il obéit à une régulation très précise qui fait que sa concentration reste constante alors même que les apports alimentaires sont discontinus.

Une hyperglycémie est due à un dysfonctionnement du pancréas aboutissant au diabète ; alors qu'une hypoglycémie indique une insuffisance hépatique.

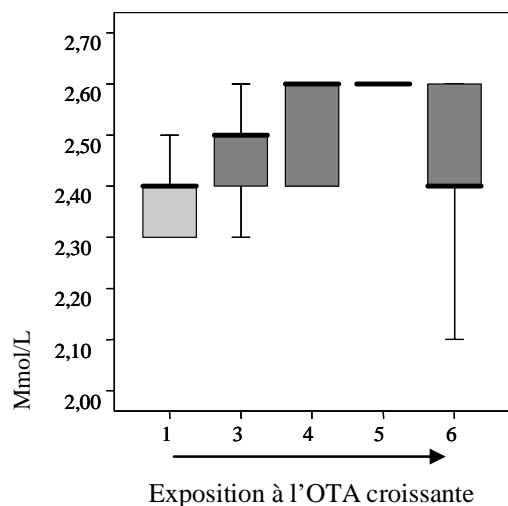
La concentration en glucose, dans le sang n'est pas modifiée en fonction du niveau de contamination en OTA du blé reçu par les animaux.

Ceci confirme qu'aux doses d'expositions des rats à l'OTA, aucune atteinte hépatique ne survient.

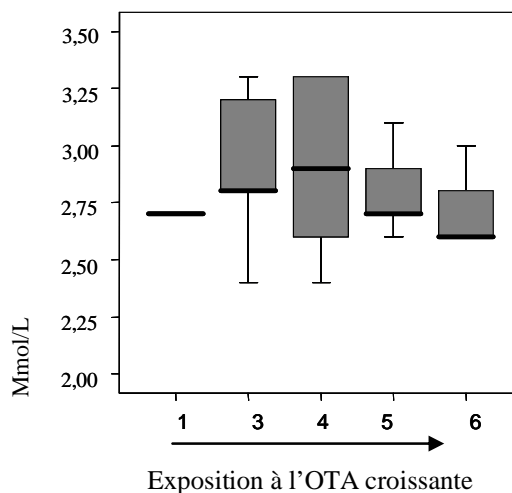
• Concentration en cholestérol

L'hypothyroïdie et les syndromes néphrotiques sont à l'origine d'une hypercholestérolémie ; alors que l'hyperthyroïdie, une hépatite sévère, ou une cholestase (anomalie de la sécrétion biliaire), entraînent une hypocholestérolémie

La concentration en cholestérol dans le sang des rats des différents groupes est présentée sur les graphes 64 et 65.



Graph 64



Graph 65

Graph 64. concentration en cholestérol, en mmol/l, dans le sang des rats femelles

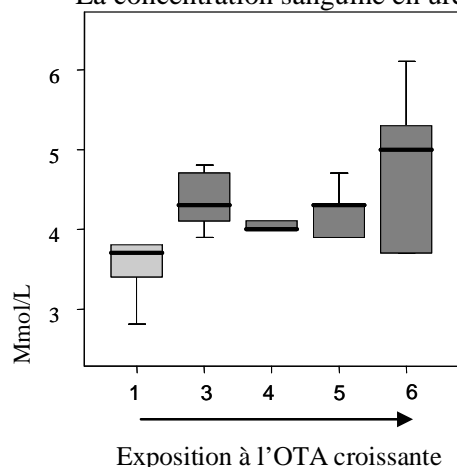
Graph 65. concentration en cholestérol, en mmol/l, dans le sang des rats mâles

La concentration en cholestérol n'est pas significativement modifiée, pour les rats mâles et femelles, recevant les lots de blé artificiellement contaminés en OTA. Néanmoins, une tendance à l'augmentation, par comparaison des valeurs médianes, semble être observée chez les femelles suivant un effet en « cloche » ; ceci peut être un artéfact. En effet, au sein du groupe 5 des rats femelles, la concentration en cholestérol dans le sang des rats est accrue, cependant, on note la présence d'un animal ayant une concentration en cholestérol particulièrement faible (1,9mmol/l), non prise en compte par le logiciel statistique.

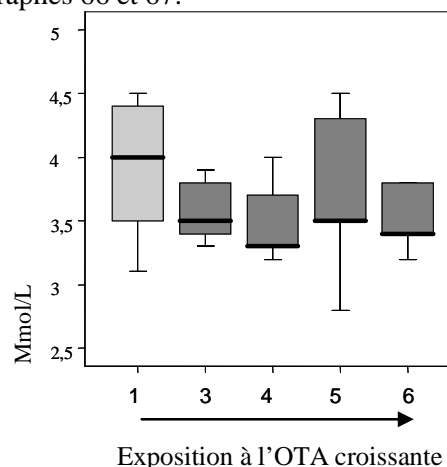
• Concentration sanguine en urée

Le dosage de l'urée permet en premier lieu de caractériser une insuffisance rénale. L'urée peut être abaissée en cas d'insuffisance hépatique sévère ou en cas de jeûne prolongé. L'urée est augmentée en cas d'insuffisance rénale, quelle que soit son origine.

La concentration sanguine en urée est présentée sur les graphes 66 et 67.



Graph 66



Graph 67

Graph 66. concentration en urée, en mmol/l, dans le sang des rats femelles.

Graph 67. concentration en urée, en mmol/l, dans le sang des rats mâles.

La concentration en urée est significativement augmentée dans le sang des rats femelles des groupes 3, 4 et 5, recevant un aliment artificiellement contaminé en OTA. Aucune variation n'est observée chez les rats mâles.

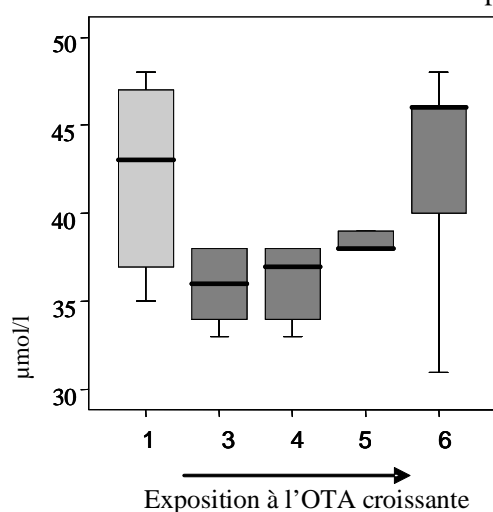
Cette variation de la concentration en urée peut être le signe d'une insuffisance rénale ; néanmoins, il est à noter que les rats ont été soumis à une période de jeûne avant le prélèvement du sang, lequel peut être partiellement à l'origine de l'effet observé.

• Concentration en créatinine

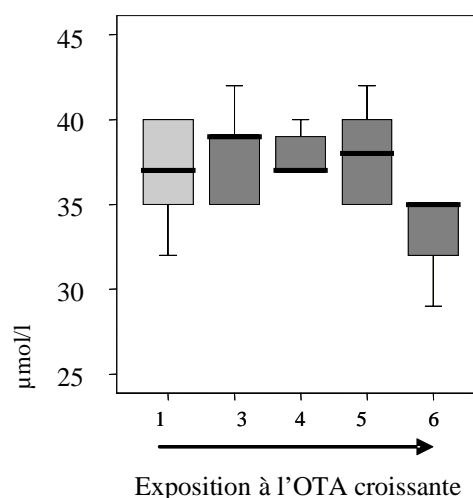
La créatinine, dans l'organisme, provient de la dégradation de la créatine qui est, d'une part contenue dans l'alimentation, et d'autre part produite par l'organisme (et principalement localisée dans les muscles). La créatinine est exclusivement éliminée par les reins, ce qui en fait un très bon marqueur de la fonction rénale.

La créatinine s'élève, par accumulation, dans toutes les insuffisances rénales. Une baisse est observée lors de dénutrition.

La concentration en créatinine est présentée sur les graphes 68 et 69.



Graph 68



graph 69

Graph 68. concentration en créatinine, en $\mu\text{mol/l}$, dans le sang des rats femelles

Graph 69. concentration en créatinine, en $\mu\text{mol/l}$, dans le sang des rats mâles

Pour les rats mâles, le taux en créatinine dans le sang n'est pas modifié pour les rats exposés à des doses inférieures ou égales à $3,5\mu\text{g/kg pc/jour}$. On observe une tendance à la baisse du taux de créatinine, chez les rats mâles du groupe 6, exposés à la plus forte dose d'OTA (8500ng/kg pc/jour).

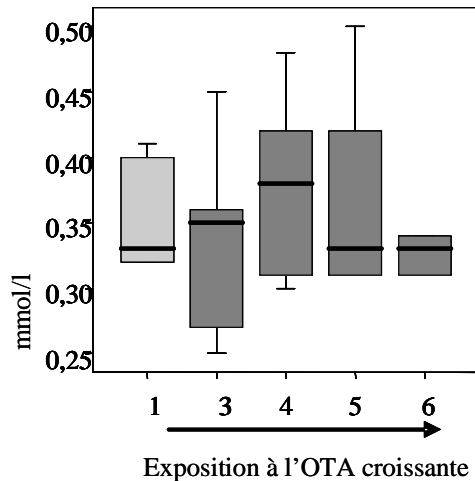
Pour les rats femelles, on n'observe pas de variations significatives de la concentration sanguine en créatinine. Néanmoins, une tendance à la diminution du taux de créatinine est observée pour les groupes 3, 4 et 5, le taux en créatinine des rats du groupe 6 est équivalent à celui des rats du groupe 1 : on observe un effet « en cloche », avec un effet maximal pour les expositions intermédiaires en OTA.

Ces tendances à la baisse observées ne traduisent vraisemblablement pas une altération de la fonction rénale ; celles-ci peuvent éventuellement s'expliquer par le fait que les animaux avaient jeûné le jour précédant le prélèvement sanguin.

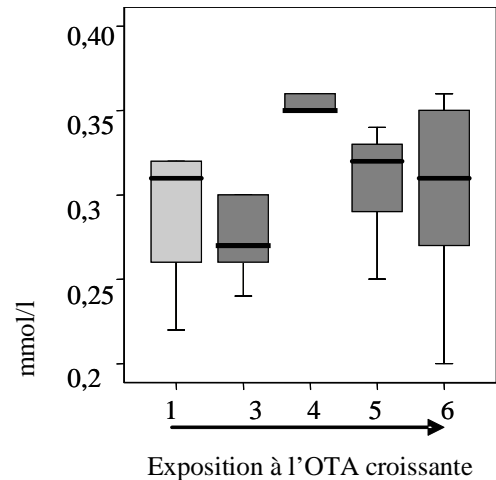
• Concentration en triglycérides

Les triglycérides font partie des graisses de l'organisme, rapidement métabolisables pour fournir de l'énergie. Les triglycérides sont augmentés au cours des pancréatites aiguës (mais l'hypertriglycéridémie peut induire une pancréatite).

La concentration sanguine en triglycérides est présentée sur les graphes 70 et 71.



Graphe 70



Graphe 71

Graphe 70. concentration en triglycérides, en mmol/l, dans le sang des rats femelles

Graphe 71. concentration en triglycérides, en mmol/l, dans le sang des rats mâles

La concentration en triglycérides n'est pas modifiée, à l'exception de celle du groupe de rats mâles 4, exposés à 500ng d'OTA/kg pc/j, qui est augmentée.

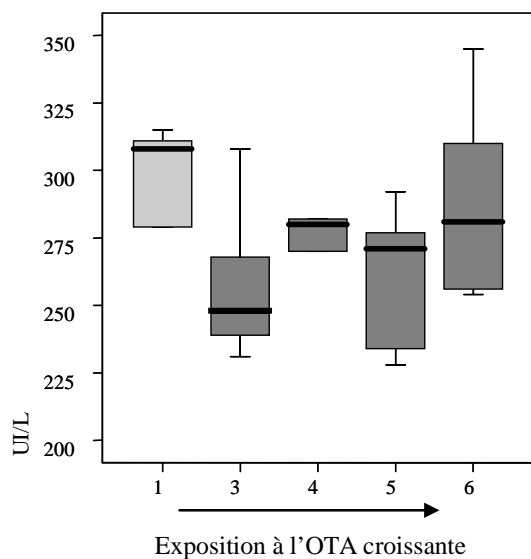
3.3.1.2.2.3 Concentration sanguine en phosphatase alcaline (ALP), aspartate amino transférase (ASAT), alanine amino transférase (ALAT)

Les transaminases sont des enzymes importantes de l'organisme, dont le rôle consiste à transférer un groupe amine lors des nombreux processus chimiques qui se déroulent au niveau hépatique. Les organes les plus riches en ces enzymes sont le foie, en ce qui concerne les ALAT (Alanine Amino Transférase ou Glutamate Pyruvate transaminase), et les muscles, y compris le cœur, en ce qui concerne les ASAT (Aspartate Amino Transférase ou Glutamate Oxaloacétique Transaminase)

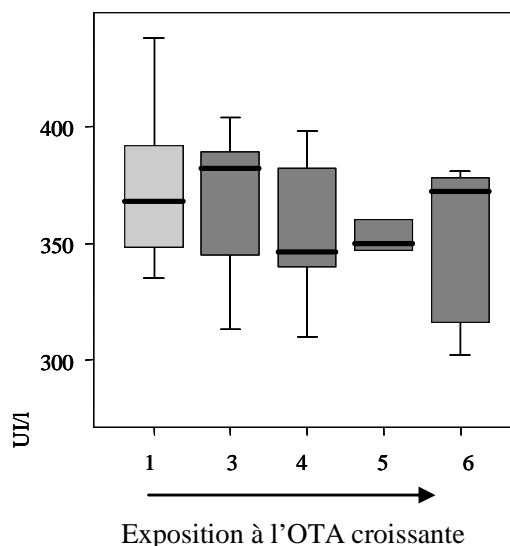
Toute altération de ces organes va conduire à une libération des transaminases. Lorsque l'élévation de l'ALAT est supérieure à celle de l'ASAT, ceci signifie qu'il y a une atteinte hépatique. Dans le cas d'atteinte musculaire ou cardiaque, ou lors d'hypothyroïdie, l'ASAT augmente plus que l'ALAT.

• Concentration en ALP

Les phosphatases alcalines sont des enzymes présentes dans pratiquement tout l'organisme, mais avant tout dans le foie et les os. Une diminution de la concentration en phosphatases alcalines est rencontrée lors de cas d'hypothyroïdie et d'insuffisance hépatique sévère. Une élévation des phosphatases alcalines s'observe lors maladies hépatobiliaires.



Graphe 72



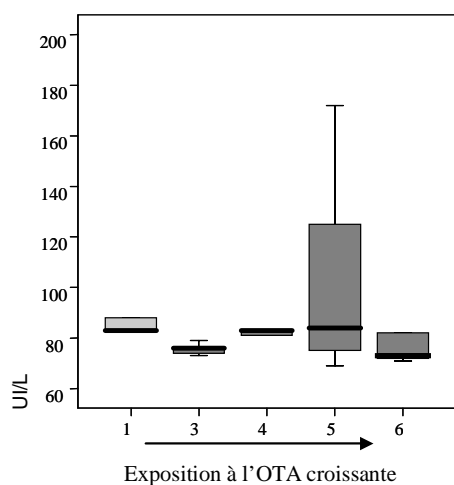
Graphe 73

Graphe 72. concentration en ALP, en UI/l, dans le sang des rats femelles

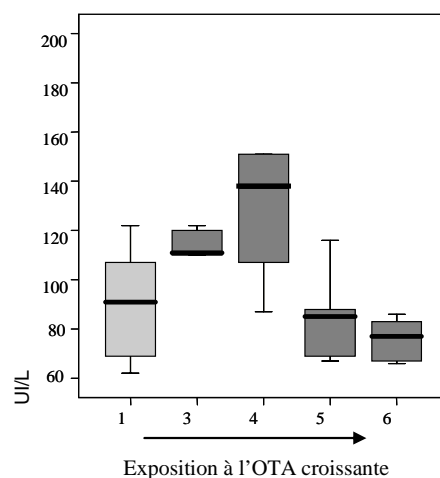
Graphe 73. concentration en ALP, en UI/l, dans le sang des rats mâles

Quel que soit le groupe ou le sexe des animaux, la concentration sanguine en ALP n'est pas significativement modifiée.

- Concentration en ASAT**



Graphe 74



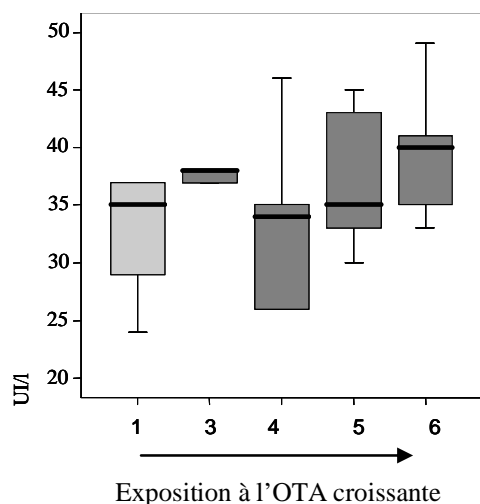
Graphe 75

Graphe 74. concentration en ASAT, en UI/l, dans le sang des rats femelles

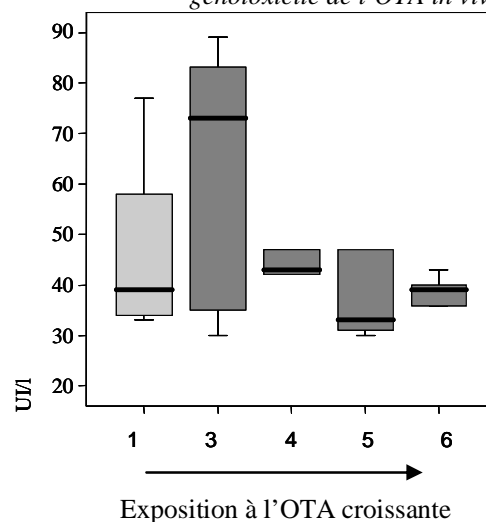
Graphe 75. concentration en ASAT, en UI/l, dans le sang des rats mâles

La concentration sanguine en ASAT n'est pas modifiée pour les rats femelles. Chez les rats mâles des groupes 3 et 4, la concentration sanguine en ASAT est augmentée par rapport au groupe 1 : on observe un effet « en cloche ».

- Concentration en ALAT**



Graphe 76



Graphe 77

Graphe 76. concentration en ALAT, en UI/l, dans le sang des rats femelles

Graphe 77. concentration en ALAT, en UI/l, dans le sang des rats mâles

La concentration sanguine en ALAT ne varie pas significativement, et ce quel que soit le groupe ou le sexe des rats. Au sein du groupe 3 des rats femelles, deux animaux ont une concentration sanguine en ALAT (24UI/l et 41UI/l) qui est considérée comme non représentative du groupe par le logiciel statistique ; de plus, la valeur d'un animal du groupe 1 est exclue par le logiciel (50 UI/l). La prise en compte de ces deux valeurs, ainsi que celle de l'importante variabilité existant concernant la concentration en ALAT conduisent à considérer les variations observées au sein du groupe 3 de rats femelles comme non significatives.

La concentration en ALAT est modifiée chez les rats mâles (graphe 77). Cependant, celle-ci ne s'accompagne pas d'une variation de la concentration en ASAT, montrant que la fonction hépatique n'est pas altérée.

3.3.2 Génotoxicité

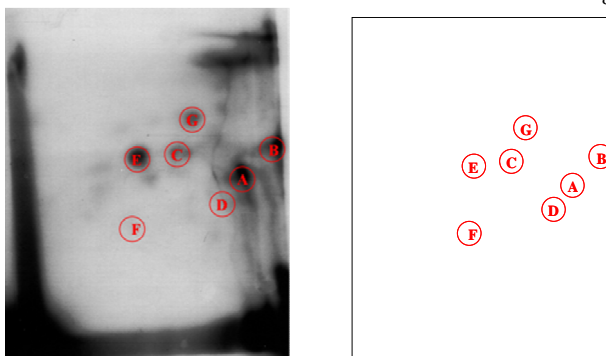
Nous avons cherché à déterminer le potentiel génotoxique de l'OTA par la mise évidence la formation d'adduits à l'ADN dans les organes des rats. La formation d'adduits à l'ADN est une étape déterminante dans la survenue des cancers (Hemminki *et al*, 2000). Nous avons recherché la formation d'adduits à l'ADN dans les organes cibles de l'OTA (Foie et reins).

L'ADN a été extrait sur un mélange d'organes de plusieurs individus du même groupe de rats, et les adduits ont été marqués au P^{32} . La séparation est réalisée par migration multidimensionnelle sur des plaques de chromatographie en polyéthylène imine (échangeuses d'anions). La séparation des adduits, au niveau de l'ADN rénal et hépatique, a été réalisée selon deux techniques : la technique avec transfert des adduits par contact (contact-transfert, méthode classiquement utilisée au laboratoire) et la technique de séparation multidirectionnelle, sans contact-transfert. Ces deux techniques sont décrites au paragraphe matériel et méthode.

3.3.2.1 Potentiel génotoxique de l'OTA au niveau rénal

3.3.2.1.1 Etude de la formation des adduits à l'ADN par la méthode chromatographique multidimensionnelle

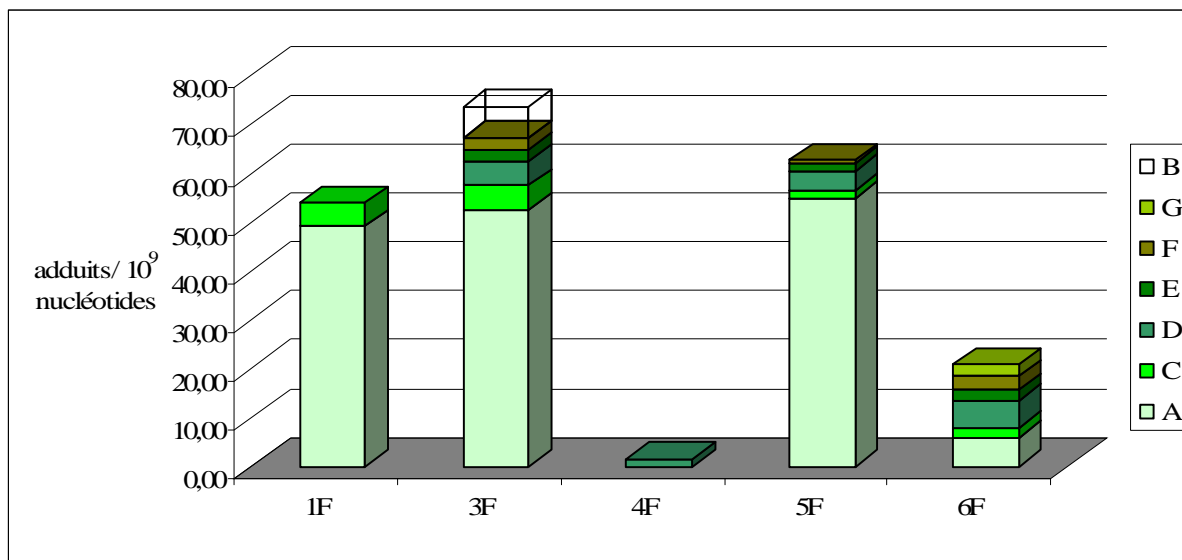
Un exemple d'autoradiogramme, obtenu suite au marquage de l'ADN rénal des rats mâles du groupe 6, est présenté ci-dessous (Autoradiogramme 30).



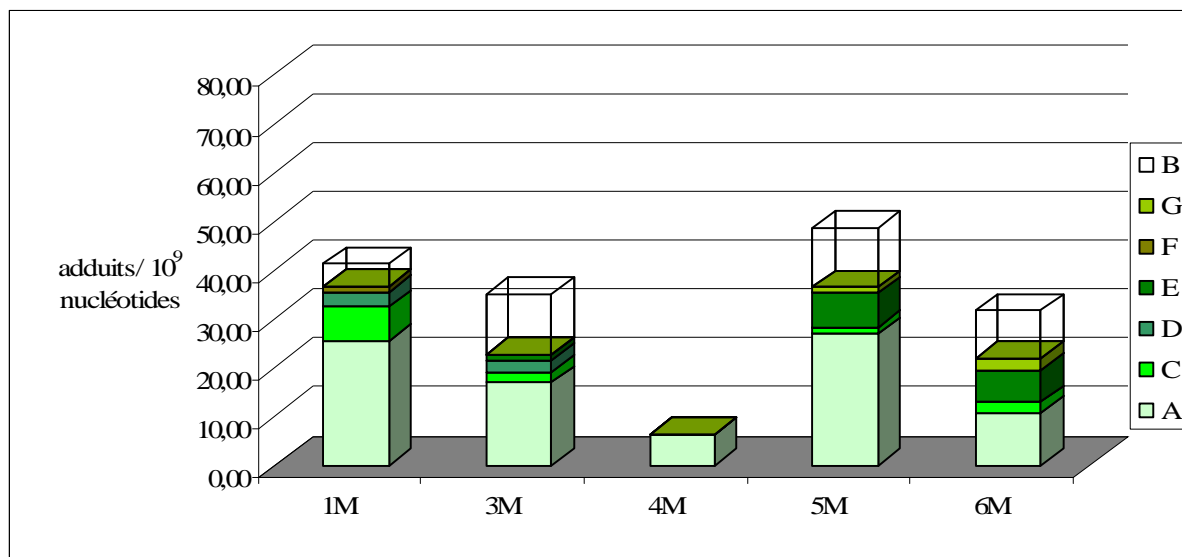
Autoradiogramme 30 : dénomination des principaux adduits à l'ADN des reins de rats exposés à l'OTA : exemple de rats du groupe 6.

La séparation par chromatographie multidimensionnelle des adduits à l'ADN des rats permet une bonne séparation et identification des adduits, cependant, on note sur les chromatogrammes la présence d'impuretés qui contribuent à augmenter le bruit de fond.

Les principaux adduits à l'ADN détectés au niveau rénal sont numérotés de A à G. Plusieurs adduits minoritaires sont également détectés sur les autoradiogrammes, cependant, ils sont en dessous du seuil de quantification du bioimager ($1 \text{ adduit} / 10^{10} \text{ nucléotide}$), et n'ont donc pas été pris en considération. L'adduit « B » migre en bord de plaque et est parfois perdu. Ces adduits ont été quantifiés et les résultats sont présentés sur les graphes 78 et 79.

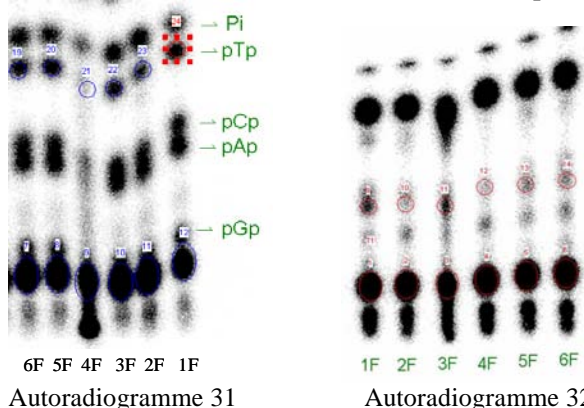


Graphe 78. quantification des différents adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/ 10^9 nucléotides, dans le rein des rats femelles des différents groupes.



Graph 79. quantification des différents adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le rein des rats mâles des différents groupes.

On détecte la présence d'adduits à l'ADN quelle que soit la dose d'exposition des animaux. Il apparaît de façon assez évidente que les résultats obtenus pour les animaux des groupes 4, femelles ou mâles, sont « inattendus » au vu des résultats obtenus pour les autres groupes. En effet, on ne détecte que très peu d'adduits à l'ADN des rats du groupe 4 alors que des adduits, en quantité systématiquement supérieure, sont détectés sur l'ADN des rats des autres groupes. Au cours du marquage de l'ADN, les étapes de contrôle témoignant du bon fonctionnement de l'hydrolyse de l'ADN ainsi que de l'étape de l'enrichissement à la nucléase P1 ont été réalisées. Le marquage des nucléotides normaux, témoigne non seulement de l'efficacité de l'étape d'hydrolyse, mais aussi, nous permet d'estimer la quantité de mononucléosides, et donc d'évaluer la quantité d'ADN marquée.



Autoradiogrammes 31 et 32 : Marquage des nucléotides normaux après hydrolyse de l'ADN (Autoradiogramme 31) et après enrichissement à la nucléase P1 (Autoradiogramme 32)

Il apparaît, en étudiant les deux contrôles (i) de marquage des nucléotides normaux et (ii) d'efficacité de la nucléase P1, que l'ADN est convenablement hydrolysé en nucléosides-3'-monophosphates, cependant, la quantité de nucléotides marqués radioactivement est très inférieure à celle des autres échantillons. La faible quantité d'ADN sur laquelle est réalisée le marquage, explique le peu d'adduits détectés sur l'ADN des rats femelles du groupe 4. Aucune anomalie n'est détectée lors du contrôle du bon déroulement des étapes d'hydrolyse de l'ADN et d'enrichissement à la nucléase P1 pour l'ADN de reins de rats du groupe 4.

Les résultats obtenus lors du marquage des adduits à l'ADN des rats femelles du groupe 4 sous-estiment la quantité réelle d'adduits formés, et ne seront pas pris en compte. D'un point de vue qualitatif, le même type d'adduit est détecté dans le rein des rats mâles et femelles.

D'un point de vue quantitatif, l'adduit A, majoritaire, est formé en quantité supérieure chez les rats femelles par rapport au rat mâle, excepté lors d'une forte exposition pour laquelle le taux de l'adduit « A » est plus important chez le mâle. La formation de cet adduit « A », aussi bien chez les femelles que chez les mâles, présente un aspect en cloche. Les adduits « B » et « E » sont préférentiellement formés chez les mâles. Chez le mâle, la formation de l'adduit « B » présente une allure en « cloche » alors que l'adduit « E » s'intensifie quand l'exposition des rats mâles à l'OTA augmente. L'adduit « G » n'est détecté que dans les groupes de rats exposés aux plus fortes doses d'OTA, et son intensité est supérieure dans le groupe 6 de rats mâles, par rapport à celle mesurée dans le groupe 5 de rats mâles. L'évolution de l'intensité de chaque adduit pris individuellement est complexe, car chaque adduit n'évolue pas de la même manière en fonction de la dose ou du sexe.

L'analyse du niveau d'adduction dans sa globalité montre que chez les rats femelles, le niveau d'adduction est stable ou croît légèrement dans les groupes 1, 3, et 5. La quantité d'adduits est nettement réduite pour la dose d'exposition la plus élevée.

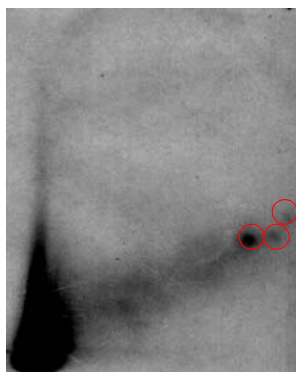
Chez les rats mâles, le taux d'adduit diminue légèrement dans le groupe 3 puis augmente dans le groupe 5 pour finalement diminuer dans le groupe exposé à la plus forte dose. Aucune évolution logique, en rapport avec le niveau d'exposition des rats, ne peut être dégagée.

Il apparaît que l'exposition des rats mâles et femelles à des quantités très faibles d'OTA (40ng/kg pc/jour) conduit à la formation d'adduits à l'ADN au niveau rénal.

3.3.2.1.2 Etude des adduits à l'ADN de rein par la méthode chromatographique bidimensionnelle avec contact-transfert

Pour confirmer ou infirmer les résultats précédemment obtenus, les adduits à l'ADN, marqués radioactivement selon le même protocole ont été séparés par la méthode de séparation par chromatographie bidimensionnelle avec « contact-transfert ».

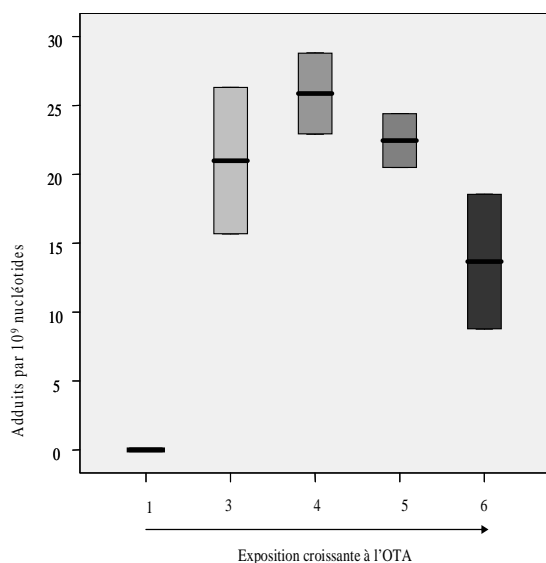
Les adduits à l'ADN ont été recherchés de façon individuelle sur 3 animaux de chaque groupe de rats mâles et femelles. Un exemple du profil observé est schématisé ci-dessous (Autoradiogramme 33).



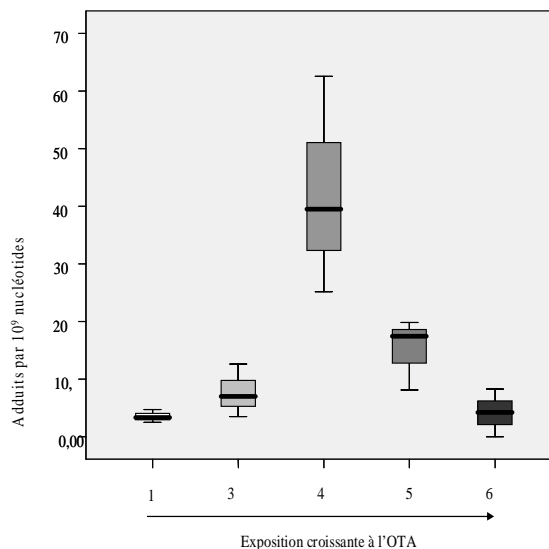
Autoradiogramme 33 : Profil chromatographique (séparation par la méthode de contact-transfert) des adduits détectés sur l'ADN rénal des rats mâles et femelles.

Nous constatons que cette méthode conduit à une séparation différente de celle observée précédemment.

La séparation des adduits par cette méthode permet de détecter la formation de 3 adduits à l'ADN des reins des rats mâles et femelles. Le nombre d'adduits totaux détecté sur l'ADN de chacun des trois animaux de chacun des groupes a été déterminé et les résultats obtenus sont présentés sur les graphes 80 et 81.



Graph 80



Graph 81

Graph 80. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le rein des rats femelles

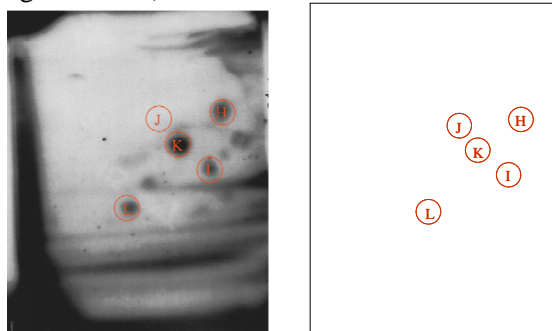
Graph 81. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le rein des rats mâles

La relation dose-effet, entre l'exposition à l'OTA et la formation d'adduits à l'ADN, n'est pas de type linéaire. On observe un effet « en cloche », aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles. Les rats mâles et femelles du groupe 4, exposés à une dose intermédiaire d'OTA (500 nanogramme/kg pc/jour), ont le plus grand nombre d'adduits à l'ADN. Le taux d'adduits est globalement le même chez les mâles et les femelles à l'exception du groupe 4 pour lequel, le taux d'adduit est nettement supérieur chez les rats mâles par rapport aux femelles (facteur 2).

3.3.2.2 Potentiel génotoxique au niveau hépatique

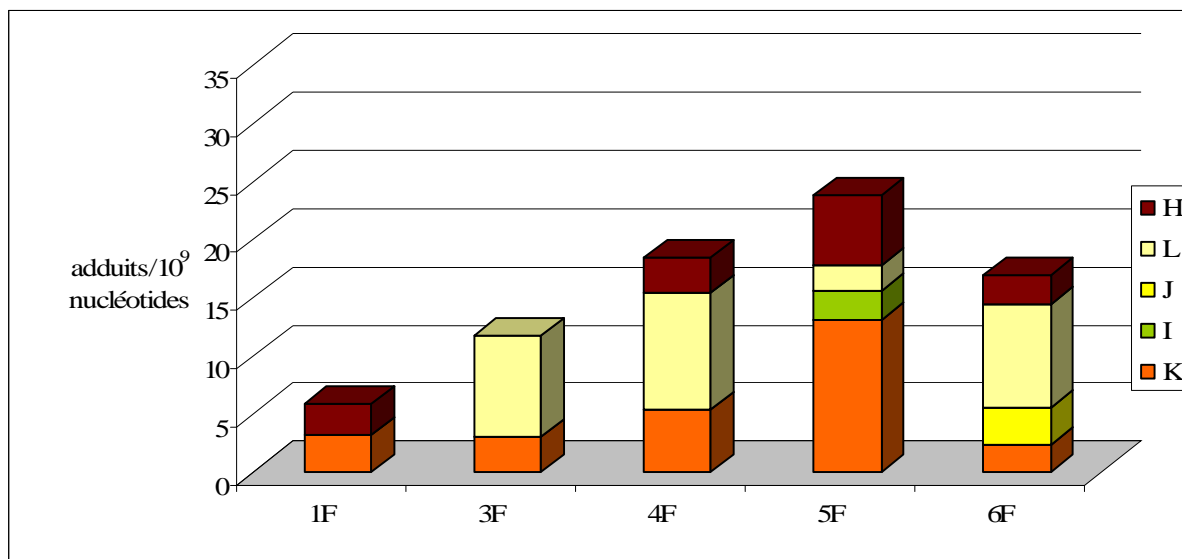
3.3.2.2.1 Séparation des adduits à l'ADN de foie par chromatographie multidimensionnelle

Les adduits à l'ADN ont été recherchés dans le foie des rats et ont été séparés par chromatographie multidimensionnelle. Le profil d'adduits « type » observé au niveau hépatique est fourni ci-dessous (Autoradiogramme 34).

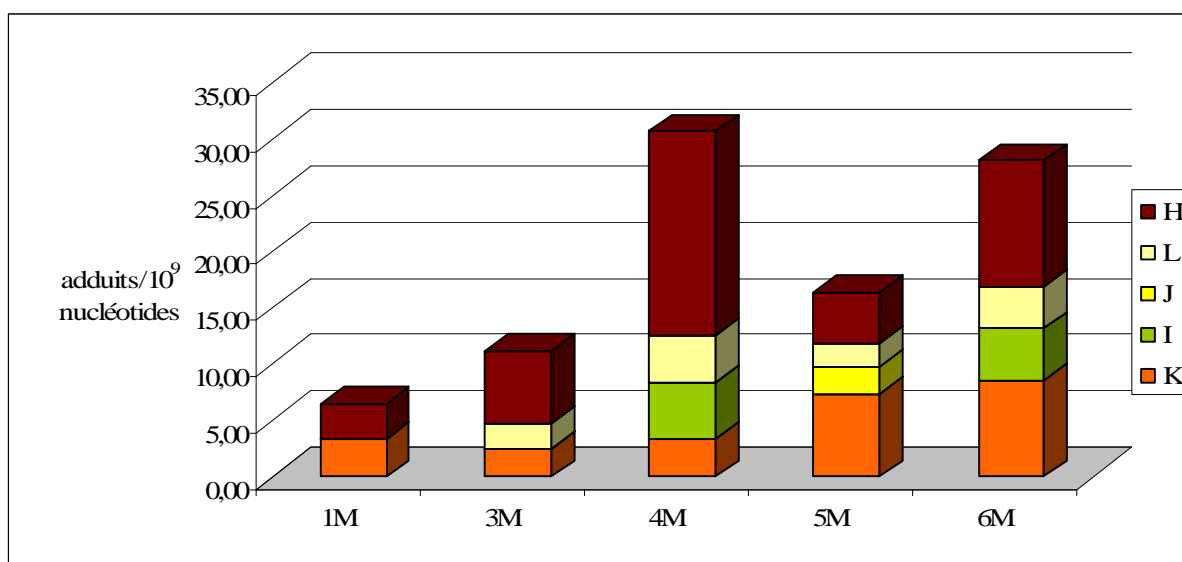


Autoradiogramme 34 : Profil chromatographique des adduits détectés sur l'ADN hépatique des rats mâles et femelles.

Les adduits hépatiques sont identifiés par des lettres de « H » à « L ». Les adduits quantifiés sur l'ADN hépatique des rats mâles et femelles sont présentés ci-dessous sur les graphes 82 et 83.



Graph 82. quantification des adduits présents sur l'ADN hépatique des différents groupes de rats femelles, en nombre d'adduits par 10^9 nucléotides.



Graph 83. quantification des adduits présents sur l'ADN hépatique des différents groupes de rats mâles, en nombre d'adduits par 10^9 nucléotides.

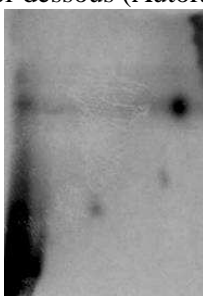
Comme pour le rein, l'analyse de l'adduction globale ne permet pas de dégager une tendance claire de l'évolution de l'adduction, en fonction de l'exposition : certains adduits augmentent quand l'exposition augmente alors que d'autres diminuent. Nous nous sommes plus particulièrement intéressé à l'adduit « K », dont les propriétés chromatographiques semblent identiques à celles de l'adduit « C » du rein, et à l'adduit « H » qui est l'adduit majoritairement formé chez le mâle. L'intensité de l'adduit « K » dépend de la dose d'exposition des rats mâles. On observe une formation en « cloche » chez les femelles avec la formation maximale de cet adduit pour le groupe 5. La formation de l'adduit « H » augmente de manière linéaire pour les faibles expositions puis plafonne chez le mâle. Chez la femelle, cet adduit est formé en moindre quantité, suivant un schéma en « cloche ». Il est à noter que les chromatogrammes obtenus lors du marquage de l'ADN de foie des rats, comme précédemment avec l'ADN de rein, ont un bruit de fond élevé, pouvant conduire à une surestimation du nombre d'adduits à l'ADN réellement présent.

Généralement, la présence d'un bruit de fond élevé, ainsi que celle d'impuretés marquées radioactivement, est liée à une mauvaise purification de l'ADN. Néanmoins, les analyses menées pour évaluer le degré de pureté ne mettaient en évidence, ni une contamination de type protéique, ni une contamination de type ARN. Le bruit de fond peut provenir du fait que, pour éviter une perte des adduits, nous sommes obligés d'augmenter la force ionique du solvant, ce qui a pour effet de retenir sans doute aussi certaines impuretés.

La méthode utilisée pour la séparation des adduits, par chromatographie multidimensionnelle, ne nous permet pas d'éliminer certaines impuretés éventuellement présentes dans les échantillons d'ADN hépatique, impuretés éliminées lors de l'utilisation de la technique de séparation avec « contact-transfert ». Nous avons répété le marquage des adduits à l'ADN hépatique et avons séparé les adduits par chromatographie bidimensionnelle avec contact transfert.

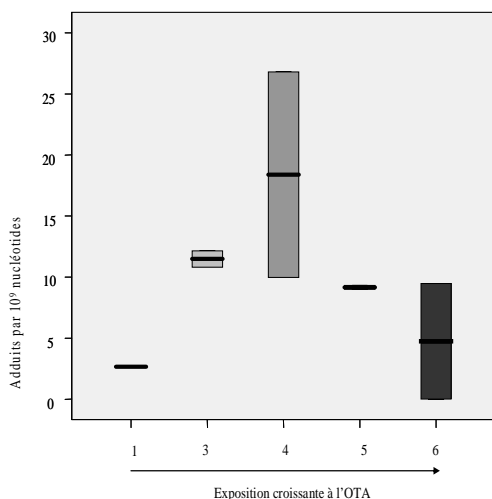
3.3.2.2 Séparation des adduits à l'ADN de foie par chromatographie bidimensionnelle avec contact-transfert

Les adduits ont été recherchés sur l'ADN de 2 animaux de chacun des groupes mâles et femelles. Le profil chromatographique est présenté ci-dessous (Autoradiogramme 35).

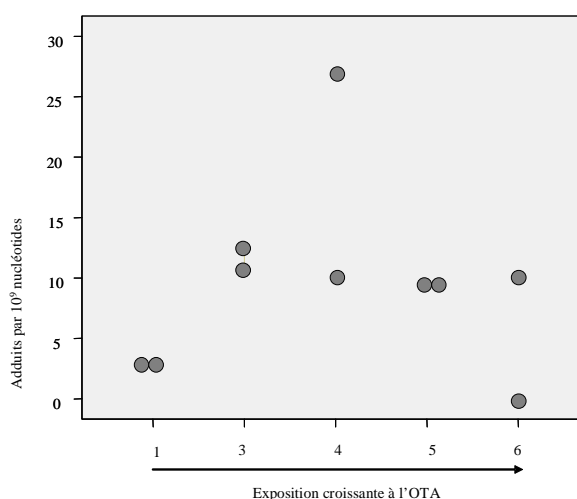


Autoradiogramme 35 : Profil chromatographique (séparation par chromatographie bidimensionnelle avec contact-transfert) des adduits détectés sur l'ADN hépatique des rats mâles et femelles.

Au cours du marquage des adduits à l'ADN et de leur séparation par la méthode de chromatographie bidimensionnelle avec contact-transfert, nous n'observons plus la présence d'impuretés sur les plaques chromatographiques. Le bruit de fond est réduit, et seuls trois adduits à l'ADN des rats sont détectés. Les adduits totaux ont été quantifiés et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (Graphe 84 et 85).

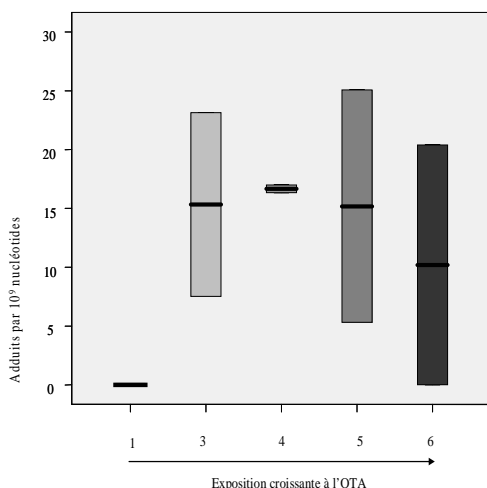


Graphe 84

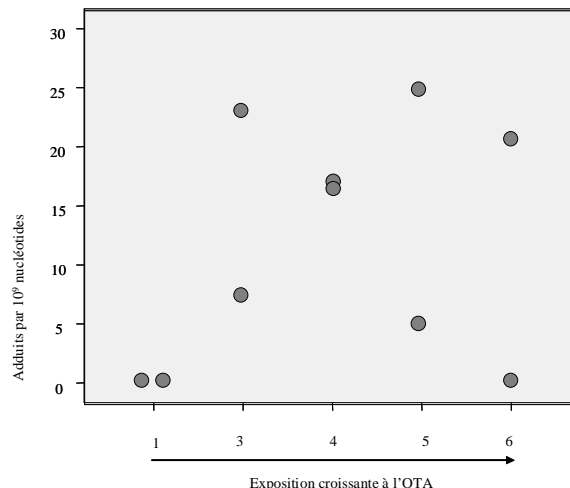


graphe 84'

Graphe 84. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le foie des rats femelles (graphe 84, représentation en boîtes à moustache ; graphe 84', présentation des valeurs individuelles).



Graph 85



Graph 85'

Graph 85. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le foie des rats mâles (graphe 85, représentation en boîtes à moustache ; graphe 85', présentation des valeurs individuelles).

Les adduits à l'ADN ayant été recherchés sur deux animaux de chacun des différents groupes, nous avons représenté les valeurs individuelles, déterminées pour chacun des animaux, sur les graphes de droite.

Chez les rats mâles, le nombre d'adduits à l'ADN des rats est relativement stable que ceux-ci soient exposés à 170 ng/kg pc/jour (groupe 3) ou à 8500 ng/kg pc/jour (groupe 6). Chez les rats femelles, le taux maximal d'adduits est détecté dans le groupe 4.

L'évolution de l'intensité de l'adduction selon un effet en « cloche » décrit au niveau rénal, est observé au niveau hépatique, chez les rats femelles.

En conclusion, la recherche des adduits à l'ADN des rats des différents groupes met en évidence la formation d'adduits même pour les plus faibles doses d'exposition à l'OTA (40ng/kg pc/jour). Nous avons utilisé deux techniques différentes pour la séparation des adduits à l'ADN. La technique avec « contact-transfert », technique couramment utilisée au laboratoire, permet d'obtenir un bruit de fond moins élevé et limite la présence d'impuretés. La séparation par cette technique conduit à l'observation d'une quantité d'adduits (qualitativement) moindre. La présence d'impuretés et d'un bruit de fond élevé, lors de la séparation en chromatographie multidimensionnelle sans « contact-transfert », nous a sans doute conduit à surestimer le nombre d'adduits à l'ADN, d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

De plus, lors de la séparation en chromatographie multidimensionnelle sans contact-transfert, nous n'avons pas observé d'adduits à l'ADN dans les rats des groupes 4. L'hypothèse, selon laquelle l'absence d'adduits était liée à un problème au cours d'une étape de l'expérience de marquage, a été confirmée : lors de la répétition du marquage sur 3 animaux mâles et femelles, et de la séparation des adduits par la seconde méthode, nous avons observé la présence systématique d'adduits.

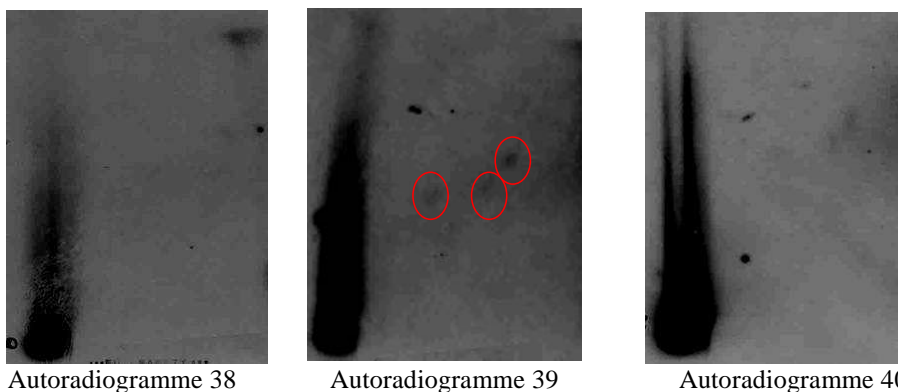
Dans les organes cibles de l'OTA, nous observons un effet « en cloche » dans la formation des adduits à l'ADN en fonction de l'exposition. L'effet est plus marqué dans chez les mâles, au niveau rénal, et chez les femelles, au niveau hépatique.

3.3.2.5 génotoxicité et métabolisation

D'un point de vue qualitatif, le même profil d'adduit est observé chez les rats mâles et femelles, par contre le profil d'adduction diffère en fonction de l'organe. Le fait que chaque organe ait un profil d'adduit qui lui est propre, confirme que le phénomène d'adduction est lié à des bio-transformations de la molécule d'OTA qui ont lieu de façon spécifique dans un organe. Plusieurs études ont impliqué la métabolisation de l'OTA dans l'expression de son potentiel génotoxique. L'adduction directe de la molécule d'OTA, suite à son activation métabolique, a été mis en évidence *in vivo* sur l'ADN de reins

de rats de la race Dark Agouty et Lewis recevant pendant 2 ans de l'OTA (Castegnaro *et al*, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998, 2002), ainsi que sur l'ADN de reins de porcs exposés de façon sub-aiguë à l'OTA (Faucet *et al*, 2004 ; Petkova-Bocharova *et al*, 2003b). Les adduits détectés au niveau rénal ressemblent à ceux détectés au cours de l'incubation d'OTA *in vitro* en présence de systèmes de métabolisation et de co-facteurs. Les résultats obtenus lors de cette expérience sont fournis à titre indicatif ci-après.

De l'ADN de saumon purifié, ne contenant aucun adduit, a été incubé avec de l'OTA, en présence ou absence de microsomes de rein de porc, et, en présence de deux cofacteurs ou de l'un ou l'autre des deux co-facteurs : l'acide arachidonique ou le NADPH. Au terme de l'incubation, les adduits ont été marqués et séparés par la méthode de chromatographie bidimensionnelle avec « contact-transfert ». Les profils d'adduction observés sont présentés ci-après.



Autoradiogrammes 38, 39 et 40: profil d'adduction suite à l'incubation d'ADN de saumon purifié en présence de 5 μ M d'OTA uniquement (autoradiogramme 38), ou en présence de 5 μ M d'OTA, de microsomes de medulla de porc, et d'un co-facteurs : l'acide arachidonique (autoradiogramme 39) ou le NADPH (autoradiogramme 40).

Il apparaît que l'incubation d'ADN avec de l'OTA seule ne conduit pas à la formation d'adduits à l'ADN dans ce modèle d'étude *in vitro*, confirmant l'implication des mécanismes de métabolisation, dans le potentiel génotoxique de cette molécule. L'incubation de l'OTA, à cette même concentration, en présence de microsomes de rein de porc conduit à la formation d'adduits à l'ADN quand de l'acide arachidonique est présent en temps que co-facteur. La formation d'adduits à l'ADN en présence de microsomes rénaux montre l'implication de la métabolisation de l'OTA dans la formation des adduits à l'ADN *in vitro*. L'adduction à l'ADN est observée essentiellement quand le co-facteur acide arachidonique est présent ; aucun adduit n'est visible quand le co-facteur NADPH est ajouté ou quand les deux co-facteurs NADPH et acide arachidonique sont présents. L'acide arachidonique est indispensable au fonctionnement des enzymes de métabolisation cycloxygénases (COXs), lipoxygénases (LOXs), et époxygénases (CYP2C) alors que le NADPH est indispensable au fonctionnement des CYPs. L'utilisation différentielle de ces deux co-facteurs indique que la formation des adduits à l'ADN dans ce modèle *in vitro* a lieu suite à la métabolisation de l'OTA par la voie des COXs, LOXs, ou époxygénases, nécessitant la présence d'acide arachidonique. De plus, il apparaît que, lorsque les deux voies de métabolisations, COXs/LOXs et CYPs sont mises en jeu, on ne détecte plus d'adduits à l'ADN.

Les adduits, détectés au niveau rénal résultent d'une métabolisation de l'OTA par la voie des COXs/LOXs/époxygénases.

L'implication de la voie des LOXs dans la génotoxicité de l'OTA a été mise en évidence sur modèle cellulaire *in vitro* (Pinelli *et al*, 1999). Le pré-traitement des cellules par l'indométhacine à faible dose, un activateur de la voie des lipoxygénases, conduit à une augmentation du niveau d'adduction ainsi qu'à une modification de la métabolisation. A l'inverse, lors du pré-traitement par l'indométhacine à forte dose, la voie des LOXs est inhibée et une réduction du taux d'adduits est observée (Pinelli *et al*, 1999 ; Obrecht-Pflumio *et al*, 1996). L'implication de la voie des époxygénases (CYP2C) a été mise en évidence lors du traitement des cellules par le phénobarbital, augmentant l'activité de ces CYP2C9, et lors de l'utilisation de cellules exprimant spécifiquement ce CYP2C9 (El

Adlouni *et al*, 2000). Au cours d'une autre étude, la génotoxicité de l'OTA a été mise en évidence, par le test d'Ames, suite à son activation métabolique par des microsomes de reins de souris : le potentiel mutagène est plus élevé quand l'acide arachidonique est ajouté en temps que co-facteur par rapport au potentiel mutagène observé lors de l'addition de NADP (Obrecht-Pflumio *et al*, 1999). De même, l'incubation de vésicules séminales de bélier conduit préférentiellement à la formation d'adduits lors de l'addition d'acide arachidonique en temps que co-facteur (El Adlouni *et al*, 2000). Les résultats observés lors de nos essais *in vitro* confirment ceux précédemment établis. Les résultats obtenus lors de nos essais *in vitro*, et, la comparaison avec les adduits observés dans les reins des rats *in vivo*, confirment l'implication de ces voies de métabolisation dans la génotoxicité de l'OTA. De plus, ceci est confirmé par l'observation d'adduits au niveau pulmonaire, organe au niveau duquel les systèmes de métabolisation COX/LOX sont prépondérants voire exclusifs.

Des adduits différents sont détectés au niveau de l'ADN hépatique des rats mâles et femelles, impliquant d'autres systèmes de métabolisation.

Les diverses cinétiques d'adductions observées, peuvent être liées à la co-existence de deux mécanismes de métabolisation, l'un allant vers la détoxification de la molécule, et l'autre augmentant sa réactivité. Ces deux mécanismes peuvent avoir des niveaux d'expression, d'induction, et de saturation différents en fonction de l'organe. De plus, d'autres mécanismes tels que la liaison de l'OTA aux protéines, et les mécanismes de réparation de l'ADN, mécanismes qui sont également saturables, vont interférer dans la formation et la détection d'adduits à l'ADN suite à l'exposition des rats à l'OTA.

Conclusions apportées par l'étude sub-chronique d'une exposition de rats à l'OTA : toxicocinétique, toxicité générale et génotoxicité de l'OTA in vivo

Cette étude *in vivo*, au cours de laquelle des rats mâles et femelles de la race Dark Agouty ont reçu par voie orale de l'OTA, nous a permis de dégager plusieurs conclusions concernant la toxicocinétique de l'OTA ainsi que ses mécanismes d'action. Ces conclusions sont développées ci-après.

1. Il existe une transition dépendant de la dose dans la toxicocinétique de l'OTA

Au cours de cette étude, nous avons observé que la réponse à l'OTA n'est pas linéaire et qu'elle présente trois phases, illustrées sur le schéma ci-après. Jusqu'à une valeur seuil, on ne note pas de différences significatives au niveau de la concentration sanguine ou tissulaire en OTA (zone 1), au-delà de cette valeur seuil, l'augmentation de l'exposition entraîne proportionnellement une augmentation de la quantité d'OTA dans tous les compartiments de l'organisme (zone 2) jusqu'à atteindre un plateau comme observé en ce qui concerne le stockage de l'OTA au niveau rénal chez les rats mâles (zone 3). Cette valeur plateau semble être, dans notre étude, aux alentours d'une exposition à 500 ng/kg pc/jour (exposition du groupe 4).

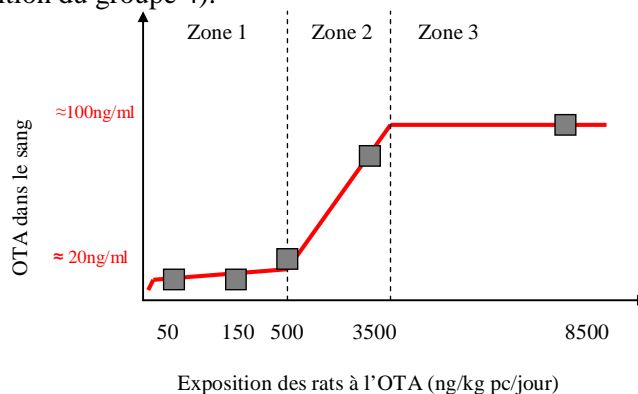


Figure 23. évolution schématique de la concentration en OTA dans le compartiment sanguin des rats exposés à des doses croissantes d'OTA.

Ceci s'explique par la conjonction de plusieurs facteurs, modulés différemment en fonction de la quantité d'OTA présente :

(i) la fixation de l'OTA aux protéines selon un phénomène saturable : l'OTA est fixée à 90% sur les protéines plasmatiques et tissulaires (Hagelberg *et al*, 1989 ; Galtier *et al*, 1979 ; Ill'ichev *et al*, 2002b, Schwerdt *et al*, 1999b) ce qui limite sa métabolisation et ralentit son élimination (Kumagai & Aibara, 1982 ; Kumagai, 1985 ; Hult *et al*, 1982).

(ii) les mécanismes de transport saturables : l'absorption, la distribution, et l'élimination de l'OTA s'effectuent principalement par des transporteurs actifs, saturables, (Kontaxi *et al*, 1996 ; Bahneman *et al* 1997 ; Jung *et al*, 2001) régulés de manière différente suivant les organes et le sexe des animaux.

(iii) la métabolisation par des enzymes inductibles et saturables : l'OTA est métabolisée dans les organes, en des composés plus facilement excrétés, ce qui en modifie sa demi-vie (Li *et al*, 1997).

En fonction de la quantité d'OTA ingérée, on se situe dans des conditions d'exposition où les différents mécanismes décrits précédemment sont exprimés à un niveau basal, sont induits ou sont saturés, conduisant à une distribution de l'OTA dans l'organisme selon deux modalités, l'une dépendant de la dose d'exposition, et l'autre indépendante de la dose d'exposition.

2. l'exposition à de faibles doses d'OTA conduit à l'apparition d'effets toxiques

Cette étude montre que même de faibles doses d'exposition peuvent entraîner des fluctuations de certains paramètres chez les rats mâles et/ou les rats femelles exposés à l'OTA *via* l'alimentation.

Nos résultats permettent de confirmer (i) l'atteinte de la fonction rénale même lors de faibles expositions (ii) l'absence d'effet ou peu d'effet sur la fonction hépatique (iii) des effets immunotoxiques (iv) des effets génotoxiques.

Une atteinte de la fonction rénale est généralement détectée par des modifications des concentrations sanguines et urinaires en divers électrolytes. L'atteinte de la fonction rénale est démontrée par une baisse parallèle de la concentration en sodium et en chlore chez les rats mâles et femelles. La concentration en d'autres électrolytes tels que phosphore inorganique, potassium ou calcium est également perturbée chez les rats mâles ou femelles.

Aucune atteinte hépatique n'est observée, puisque aucun des marqueurs d'une altération de cette fonction, n'est affecté. En effet, le taux de glucose, celui de triglycérides ainsi que des enzymes ASAT, ALAT, ALP, restent stables. Aucune baisse, du taux de fibrinogène ou de cholestérol, n'est observée. Néanmoins, chez les rats femelles, nous avons observé une variation de la concentration en fibrinogène. Par conséquent, il est possible que certaines fonctions hépatiques soient altérées chez les rats femelles, animaux pour lesquels nous avons observé une réduction de la masse relative du foie.

L'effet immunotoxique de l'OTA a été également observé. L'exposition des rats mâles et femelles aux doses les plus élevées d'OTA a pour effet une réduction de la population leucocytaire, selon un effet dépendant de la dose d'exposition. Cette réduction est liée chez les femelles à la déplétion des populations de lymphocytes et de neutrophiles. De plus, nous avons observé une tendance à la diminution de la masse du thymus chez ces rats femelles. Il a été montré sur diverses espèces que l'effet immunotoxique de l'OTA peut se traduire par une leucopénie, une lymphopénie, une régression du thymus ou une inhibition de la réponse immunitaire. L'exposition de souris gestantes à l'OTA conduit à la diminution de la proportion relative des différents lymphocytes chez les petits (Thuvander *et al*, 1996). Des doses d'OTA de 60µg/kg de nourriture administrées à des porcs conduisent à une inhibition de 10% de la réponse immunitaire (Hult *et al*, 1980, 1984). Une leucopénie est observée chez des cobayes recevant de l'OTA à la dose de 5,6 mg/kg pc (Hagelberg *et al*, 1989). Une immunosuppression est également observée chez des poulets exposés à des doses d'OTA comprises entre 0,5 et 2 mg/kg pc pendant 21 jours : celle-ci se traduit notamment par une réduction de la masse thymique et de la quantité de lymphocytes (Singh *et al*, 1990). Bien que nos doses soient inférieures à celles testées dans ces précédentes études, notre étude confirme ces effets. Nos résultats confirment par conséquent ceux publiés dans la littérature.

Le potentiel génotoxique de l'OTA a été mis en évidence par la formation d'adduits à l'ADN tant au niveau hépatique que rénal. Des adduits à l'ADN sont détectés dans les organes des rats mâles

et femelles exposés à toutes les doses d'exposition testées. L'ingestion de quantités très faibles d'OTA est susceptible d'entraîner la formation d'adduits à l'ADN.

Les mécanismes de la toxicité de l'OTA sont complexes mais il apparaît que des expositions même faibles (entre 170ng/kg pc/jour et 8,5µg/kg pc/jour) à l'OTA peuvent entraîner des modifications concernant les paramètres biochimiques sanguins et hématologiques. Les altérations de la fonction rénale et/ou hépatique sont plus prononcées pour les rats femelles que pour les rats mâles, dans les conditions d'exposition testées dans cette étude. Dans la littérature, les femelles sont plus sensibles aux effets néphrotoxiques de l'OTA (Ceović *et al*, 1991 ; O'Brien *et al*, 2001) que les rats mâles, alors que ces derniers sont plus sensibles à l'effet cancérogène de l'OTA (Bendele *et al*, 1985b ; Grosse *et al* 1997a ; Castegnaro *et al*, 1998).

3. Nous confirmons les différences concernant la toxicocinétique et la toxicité de l'OTA en fonction du sexe chez les rats de la race Dark Agouty

Les différences entre mâles et femelles concernent la distribution de l'OTA, mais également sa métabolisation et sa toxicité. Ces points sont illustrés ci-après.

(i) différences dans la toxicocinétique

Des différences, dépendantes du sexe, ont été observées concernant la toxicocinétique de l'OTA, qu'il s'agisse de sa distribution dans l'organisme, de son stockage ou de son élimination par la voie urinaire.

Pour les fortes expositions à l'OTA, la concentration plasmatique en OTA est supérieure chez les rats femelles par rapport aux rats mâles ; ceci peut être mis en parallèle avec le fait que les rats femelles stockent, dans certains organes, de l'OTA et de ses métabolites en quantités inférieures à celles des rats mâles. Cette part plasmatique d'OTA peut résulter d'un déstockage plus important de la toxine à partir des organes chez les rats femelles, ou intervenant plus précocement c'est-à-dire moins de 14 heures après l'arrêt de l'exposition des rats. Ceci peut être expliqué notamment par une différence d'affinité de l'OTA au niveau des protéines tissulaires. L'OTA a la capacité de se complexer aux protéines hépatiques et rénales (Schwerdt *et al*, 1999b), ce qui augmente sa demi-vie dans l'organe, et limite sa métabolisation. Il existe des différences d'affinité de ces protéines pour l'OTA, différences dépendantes du sexe. Celles-ci ont été mises en évidence, chez des rats Fischer, sur des homogénats protéiques de cortex rénal, les protéines des rats mâles ayant une affinité pour la liaison à l'OTA supérieure d'un facteur 3 à celle des protéines des femelles (Heussner *et al*, 2002). Nous avons également caractérisé des différences concernant le stockage de l'OTA au niveau du rein : chez les rats mâles, la quantité d'OTA stockée atteint un plateau pour les plus fortes doses d'exposition. Ce phénomène, non observé chez les rats femelles, peut avoir pour origine l'expression de transporteurs différents en fonction du sexe et ayant des seuils de saturation distincts.

L'OTA est éliminée par les urines, de façon plus efficace chez les rats femelles que chez les rats mâles des groupes exposés aux plus fortes doses. La quantité d'OTA excrétée par voie urinaire par les rats mâles, exposés aux plus fortes doses d'OTA (3500 et 8500ng/kg pc/jour soit groupes 5 et 6), n'est pas significativement différente de celle excrétée par les rats mâles exposés aux faibles doses (groupes 1, 3 et 4). Ceci peut s'expliquer non seulement par la saturation des transporteurs, mais aussi par le fait que l'OTA réduit sa propre élimination. En effet, l'exposition chronique à l'OTA induit une diminution de la capacité du tubule proximal à excréter les anions organiques (Gekle & Sibernagl, 1996).

Les modalités du transport, et du stockage de l'OTA, variant en fonction de l'organe et du sexe, peuvent être la clé des effets toxiques de la molécule.

(ii) différences dans la métabolisation

En ce qui concerne la métabolisation de l'OTA, nous notons des différences entre mâles et femelles tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Une vingtaine de métabolites peuvent être détectés dans le foie, le rein ou les urines mais pas forcément simultanément.

Le tableau ci-dessous récapitule les différences observées en fonction du sexe et des organes.

Métabolites/ tps rétention	foie			rein			urine		
sexe	♂		♀	♂		♀	♂		♀
OTβ/ 8, 5min	+	≥	+	+	≥	+	Ø	≈	Ø
2 / 10,2 min	+	≤	+	+	≥	+	+	≤	+
3 / 11,3 min	Ø		+	+		Ø	Ø	≈	Ø
4 / 13,8 min	+	≥	+	+	≥	+	+	≤	+
5 / 15,5 min	+	≥	+	+	≥	+	+	≈	+
OTα/ 18,4 min	+	≥	+	+		Ø	+	≈	+
7/ 20,1 min	+	≥	+	+	≥	+	+	≤	+
8/ 21,9 min	+	≈	+	+		Ø	+	≤	+
9/23,3 min	+	≈	+	+		Ø	+	≤	+
10/ 25,4 min	+	≈	+	+		Ø	+	≤	+
a / 26,8 min	loq		Ø	loq		Ø	+	≤	+
11/ 27,9 min	+		Ø	+		Ø	+	≤	+
b(OP-OA)/ 28,5 min	Ø ?		Ø ?	loq		Ø	+	≤	+
^c 10-OH-OTA / 29,6 min	Ø		Ø	loq		Ø	+	≈	+
12 4-S-OH-OTA / 30,8 min	+		Ø	+		Ø	+	≤	+
4-R-OH-OTA / 32,1	+	≥	+	+		Ø	+	≈	+
OTB / 33,4	loq		Ø	loq		Ø	+	≤	+
d (OTHQ ?) / 36	Ø		Ø	loq		Ø	+	≤	+
e / 38,5	loq	≈	loq	loq		Ø	+	≤	+
f / 43	loq	≈	loq	loq		Ø	+	≈	+
g / 46	loq	≈	loq	loq		Ø	+	≈	+
Me-OTA/ 56 min	+	≤	+	+	≥	+	+	≈	+

loq : limite de quantification, et détecté uniquement dans un groupe

+ : détecté dans l'organe

≥ Quantité supérieure chez les mâles par rapport aux femelles

≤ Quantité inférieure chez les mâles par rapport aux femelles

Ø : non détecté

tableau 26. présence ou absence des différents métabolites dans les différents organes et dans les urines en fonction du sexe des animaux.

D'une manière générale, la quantité de métabolites aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif est supérieure chez les mâles, que ce soit au niveau hépatique ou rénal. A l'inverse, les femelles éliminent en plus grande quantité tous les métabolites, y compris les métabolites non détectés au niveau de leurs organes (identifiés par des lettres).

Cette excrétion plus élevée, chez les rats femelles, peut expliquer la présence moindre des métabolites de l'OTA dans les organes.

D'un point de vue qualitatif, l'Ota, les métabolites n°3, 8, 9, 10 (dérivé décarboxylé de l'OTHQ), 11, OTHQ et 4-R-OH-OTA, présents dans le rein des rats mâles ne sont pas détectés chez les rats femelles. Ces différences qualitatives et quantitatives, entre mâles et femelles, concernant la métabolisation de l'OTA au niveau rénal, peuvent expliquer la susceptibilité supérieure des rats mâles par rapport à celle des rats femelles pour le développement des tumeurs rénales, et confirmer l'implication de la métabolisation dans la toxicité de l'OTA. Au niveau hépatique, les métabolites a, 11 et 12 (4-S-OH-OTA) présents chez les mâles, sont absents ou quasi-absents du foie des rats femelles

L'élimination plus efficace de l'OTA et de ses métabolites par les rats femelles, peut expliquer la sensibilité moindre de celles-ci aux effets carcinogènes de l'OTA.

(iii) différences dans la toxicité

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, nous avons caractérisé une atteinte de la fonction rénale, notamment par la baisse du taux de sodium sanguin; néanmoins, d'autres paramètres signant cette atteinte diffèrent entre mâles et femelles. En effet, on note une augmentation de la concentration sanguine en potassium et en phosphore inorganique simultanément à une baisse du calcium suivant un effet en « cloche » uniquement chez les rats mâles. Chez les rats femelles les paramètres qui pourraient indiquer une atteinte de la fonction rénale sont le cholestérol et l'urée, dont le taux est augmenté. Il est probable que chez la femelle le mécanisme passe par un phénomène inflammatoire, manifesté par l'augmentation du taux de plaquettes sanguines et du taux de fibrinogène sanguin. Le taux sanguin en sodium, est plus fortement perturbé chez les rats femelles que chez les mâles. Cette différence peut être expliquée en considérant les mécanismes de transport du sodium au niveau rénal : celui-ci est effectué par trois types de transporteurs, dont un, le transporteur ENaC affecté par l'OTA pour des expositions très faibles, est contrôlé par des hormones (Blazer-Yost *et al*, 2005).

Les différences concernant les effets toxiques de l'OTA peuvent être mises en parallèle avec les différences concernant la formation et l'élimination des différents métabolites.

4. Il existe une très importante variabilité inter-individuelle concernant la toxicocinétique et la toxicité de l'OTA

Il est à noter que les animaux entrant dans cette étude étaient supposés avoir le même âge. Néanmoins, la disparité notée concernant le poids des rats laisse suspecter que certains animaux étaient plus âgés que d'autres. Ces disparités dans l'âge et le poids des rats peuvent tout ou partie expliquer l'importante variabilité interindividuelle observée chez les rats exposés à des doses identiques d'OTA. La variabilité inter-individuelle a déjà été mise en avant dans d'autres études. En effet, des fluctuations de la concentration plasmatique en OTA, en fonction de l'individu, ont été mises en évidence (Studer-Rohr *et al*, 2000 ; Palli *et al*, 1999) et ont été associées à une variabilité concernant la taille de l'individu lors d'études menées chez l'homme (Palli *et al*, 1999). De même, l'analyse de la teneur sérique en OTA chez des hommes d'une région où sévit la BEN, a permis de mettre en évidence de fortes variations de cette teneur, bien que l'exposition des individus soit identique (Petkova-Bocharova *et al*, 2003a ; Castegnaro *et al*, 2006a ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2006). En outre, la concentration plasmatique en OTA, chez un même individu, peut fluctuer au cours du temps : le suivi de la concentration plasmatique en OTA, chez des moutons recevant tous les jours un aliment contaminé en OTA, a montré que le taux plasmatique d'OTA était supérieur après 23 jours d'expérimentation par rapport au taux déterminé après 29 jours de traitement (Blank *et al*, 2003). Cette variation de la concentration plasmatique en OTA au cours du temps a également été observée chez l'homme (Studer-Rohr *et al*, 2000). L'existence de ces variations inter- et intra-individuelles (en fonction du temps), expliquent la dispersion des résultats observée chez les rats.

5- L'OTA peut, ou non, exercer une toxicité selon un effet dépendant de la dose

Nous avons observé tantôt un effet toxique dépendant de la dose d'OTA ingérée, et tantôt un effet toxique qui évolue selon un effet en cloche.

Lorsque la réponse suit cette évolution « en cloche », les effets les plus prononcés sont observés pour le groupe 4 exposé à une dose intermédiaire en OTA (dose d'exposition 500ng/kg pc/jour). Ceci confirme les résultats de Gekle *et al* (2005) montrant des réponses à une exposition à l'OTA inversées en fonction de la dose, sur les tubules proximaux.

L'effet « en cloche » a été notamment observé en ce qui concerne le potentiel génotoxique de l'OTA. Ceci peut être expliqué en considérant l'implication de divers mécanismes allant soit vers la détoxification de la molécule, soit vers sa métabolisation en un composé toxique. De plus, d'autres mécanismes tels que la liaison de l'OTA aux protéines, et les mécanismes de réparation de l'ADN, mécanismes qui sont également saturables, vont interférer dans la formation et la détection d'adduits à l'ADN suite à l'exposition des rats à l'OTA.

Nous avons noté que la quantité d'adduits formés dans le rein et le foie des rats était supérieure dans les groupes exposés à une dose intermédiaire d'OTA. Ceci peut être expliqué en considérant que le potentiel génotoxique de l'OTA implique sa métabolisation en un dérivé réactif. Le

fait que chaque organe ait un profil d'adduit qui lui est propre, confirme que le phénomène d'adduction est lié à des bio-transformations de la molécule d'OTA qui ont lieu de façon spécifique dans un organe. Plusieurs études ont impliqué la métabolisation de l'OTA dans son potentiel génotoxique. L'adduction directe de la molécule d'OTA, suite à son activation métabolique, a été mise en évidence *in vivo* sur l'ADN de reins de rats de la race Dark Agouty et Lewis recevant pendant 2 ans de l'OTA (Castegnaro *et al*, 1998 ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998, 2002), ainsi que sur l'ADN de reins de porcs exposés de façon sub-aiguë à l'OTA (Faucet *et al*, 2004 ; Petkova-Bocharova *et al*, 2003b). Les adduits détectés au niveau rénal ressemblent à ceux détectés au cours de l'incubation d'OTA *in vitro* en présence de systèmes de métabolisation et de co-facteurs. Ces résultats suggèrent l'implication de la voie des COX/LOX/EPOX dans la métabolisation de l'OTA, conduisant à la formation de métabolites génotoxiques. Ceci confirme des résultats précédemment établis puisque l'implication de la voie des LOXs dans la génotoxicité de l'OTA a été mise en évidence sur modèle cellulaire (Pinelli *et al*, 1999). Le pré-traitement des cellules par l'indométhacine à faible dose, un activateur de la voie des lipoxygénases, conduit à une augmentation du niveau d'adduction ainsi qu'à une modification de la métabolisation. A l'inverse, lors du pré-traitement par l'indométhacine à forte dose, la voie des LOXs est inhibée et une réduction du taux d'adduits est observée (Pinelli *et al*, 1999 ; Obrecht-Pflumio *et al*, 1996). L'implication de la voie des époxygénases (CYP2C) a été mise en évidence lors du traitement des cellules par le phénobarbital, augmentant l'activité de ces CYP2C9, et lors de l'utilisation de cellules exprimant spécifiquement ce CYP2C9 (El Adlouni *et al*, 2000).

La compréhension de la toxicocinétique ainsi que des effets toxiques de l'OTA sont une étape nécessaire afin de pouvoir, par la suite, évaluer l'innocuité du procédé Oxygreen®. Ceci nous permettra notamment de déterminer si les effets toxiques observés chez les rats recevant le blé traité sont liés à la quantité d'OTA résiduelle ingérée par les animaux, ou si ceux-ci sont en relation avec le traitement du blé par le procédé Oxygreen®.

Chapitre 4 : Incidence de la décontamination du blé par le traitement Oxygreen® sur la toxicité

4.1 Etude *in vivo* et exposition des rats à l'OTA

Nous avons vu précédemment que le procédé Oxygreen® permet de réduire le taux en OTA du blé de 50 à 70%. Les lots de blé, contaminés en OTA et traités par le procédé Oxygreen®, ont été utilisés dans une étude *in vivo* avec les rats Dark Agouty. Le modèle de l'étude *in vivo* est identique à celui décrit au chapitre 3, paragraphe 3.1.1 et dans le Matériel et Méthode.

L'exposition des rats, recevant un lot de blé contaminé en OTA, et, traité ou non par le procédé Oxygreen®, a été déterminée sur la base de la consommation journalière en blé de ces animaux. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux ci-après.

Contamination du blé (ppb)	groupes femelles	Consommation journalière de blé (g/jour)	Exposition journalière à l'OTA (µg/kg pc/jour)
0,50	1 (contrôle)	9,94 +/- 0,39	0,044 +/- 0,002
40	5	10,76 +/- 0,49	3,5 +/- 0,17
11	5 Ox®	10,19 +/- 0,65	0,73 +/- 0,021
100	6	10,67 +/- 0,4	8,482 +/- 0,444
45	6 Ox®	10,04 +/- 0,76	3,59 +/- 0,123

tableau 27. contamination en OTA du blé exprimée en ppb, consommation journalière de blé exprimée en g/jour et exposition à l'OTA exprimée en µg/kg pc/jour des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (police verte), ou non traité (police noire).

Contamination du blé (ppb)	groupes mâles	Consommation journalière de blé (g/jour)	Exposition journalière à l'OTA (µg/kg pc/jour)
0,50	1 (contrôle)	11,69 +/- 0,79	0,043 +/- 0,003
40	5	12,26 +/- 1,39	3,465 +/- 0,134
11	5 Ox®	11,36 +/- 1,46	0,68 +/- 0,038
100	6	11,93 +/- 1	8,151 +/- 0,854
45	6 Ox®	11,96 +/- 1,33	3,38 +/- 0,22

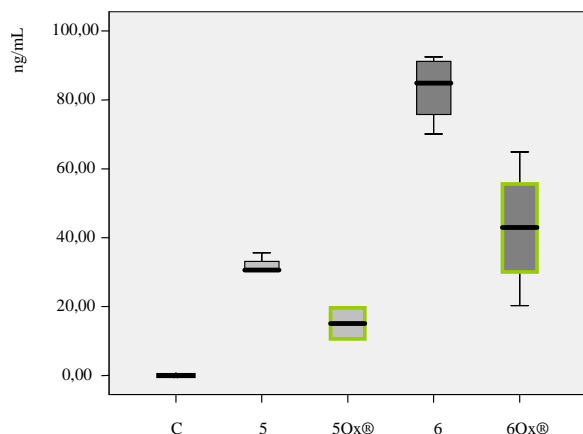
tableau 28. contamination en OTA du blé exprimée en ppb, consommation journalière de blé exprimée en g/jour et exposition à l'OTA exprimée en µg/kg pc/jour des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (police verte), ou non traité (police noire).

Les animaux recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (groupes 5Ox® et 6Ox®), ne modifient pas leur consommation en blé. Ainsi, la diminution du niveau de contamination en OTA du blé, par l'application du traitement Oxygreen®, se traduit par une réduction équivalente du niveau d'exposition des rats à l'OTA.

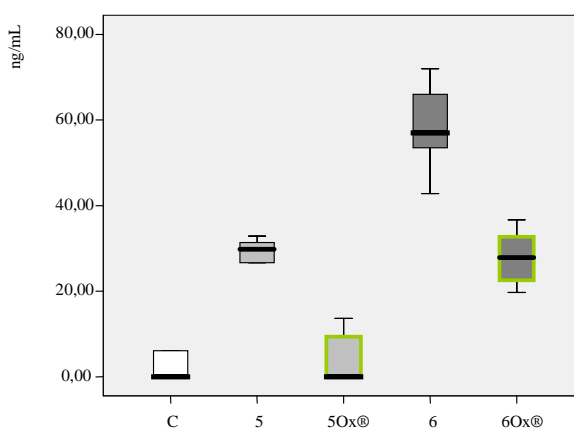
4.2 Toxicocinétique de l'OTA résiduelle

4.2.1 OTA sérique

De même que décrit précédemment, la concentration en OTA dans le sérum des rats des différents groupes a été déterminée. Les résultats sont présentés sur les graphes ci-après.



Graph 86



graphe 87

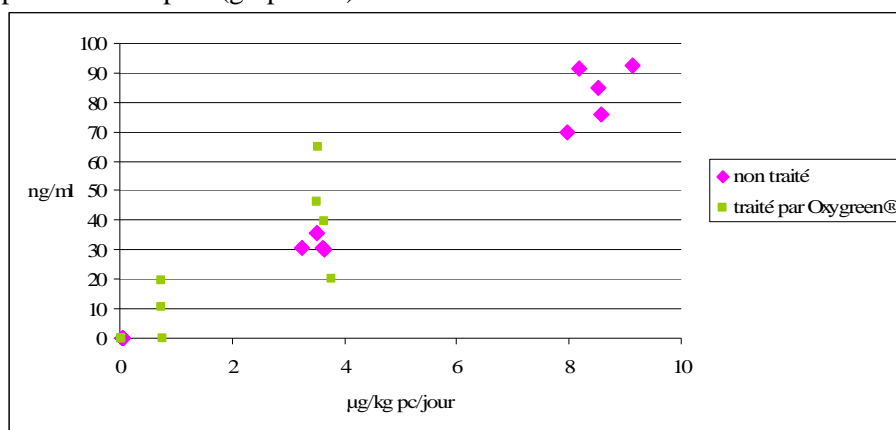
Graph 86. concentration en OTA, exprimée en ng/ml, dans le sérum des rats femelles, recevant un blé traité (cadre extérieur vert), ou non par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur noir).

Graph 87. concentration en OTA, exprimée en ng/ml, dans le sérum des rats mâles, recevant un blé traité (cadre extérieur vert), ou non par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur noir).

Pour les rats femelles, la concentration sérique en OTA est réduite de 53% entre les groupes 5 et 7, et, de 49% entre les groupes 6 et 8 en moyenne (graphe 86). Pour les femelles des groupes 5 et 7, la diminution de la concentration sérique est moins importante que la diminution de l'exposition de ces rats à l'OTA par le traitement Oxygreen® (diminution de 70% du taux de contamination en OTA du blé). Pour les rats mâles, la diminution de l'exposition, suite à l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, se traduit par une réduction significative de la quantité d'OTA circulant dans le compartiment sanguin.

Pour les rats mâles, la réduction de la concentration sérique en OTA est de 83% entre les groupes 5 et 7, et, de 52% entre les groupes 6 et 8. Ces taux sont proches des taux de réduction du niveau de contamination en OTA du blé, soit respectivement 70 et 53% en moyenne.

L'évolution de la concentration sérique en OTA en fonction de la dose d'exposition des rats femelles est présentée ci-après (graphe 88).



Graph 88. évolution de la concentration sérique en OTA, exprimée en ng/ml, en fonction du niveau d'exposition des rats femelles, exprimé en µg/kg pc/jour.

Pour les rats femelles exposées à 3,5 µg/kg pc/jour, on constate que la concentration sérique en OTA a tendance à être supérieure, et surtout beaucoup plus dispersée, quand les rats sont exposés via

un aliment traité par le procédé Oxygreen® (carrés verts sur le graphe 88), par rapport à une exposition *via* un blé non traité (losanges roses sur le graphe 88). De plus, nous observons, au sein des groupes de rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, une forte variabilité concernant la concentration sérique en OTA.

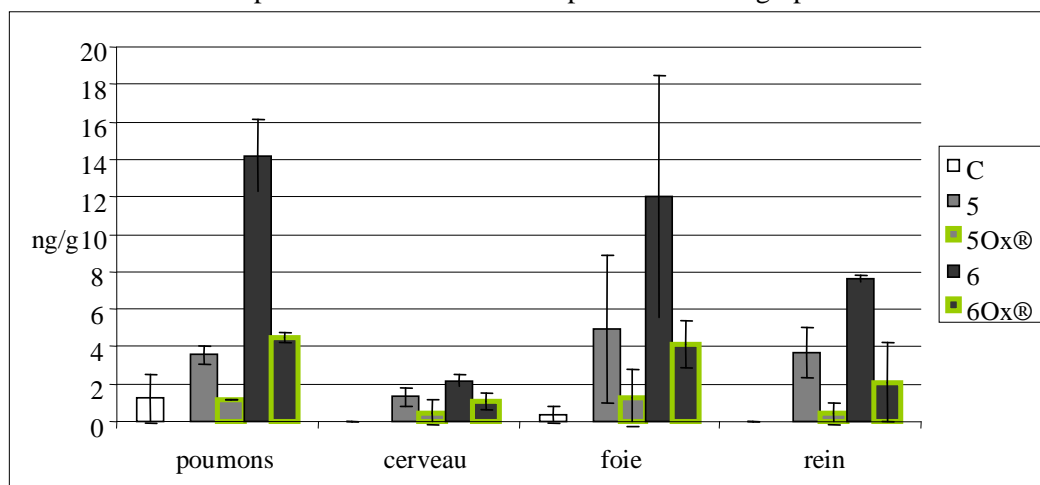
Chez les rats mâles, la concentration sérique en OTA dépend directement de la dose d'exposition : une quantité équivalente d'OTA est retrouvée le sérum, que les rats aient été exposés à une dose journalière de 3,5µg/kg pc *via* un blé traité par le procédé Oxygreen® ou *via* un blé non traité.

4.2.2 Distribution et métabolisation de l'OTA

4.2.2.1 Distribution de l'OTA dans les différents organes

L'OTA a été recherchée dans les reins, le foie, les poumons, le cerveau des rats mâles et femelles, ainsi que dans les testicules des rats mâles.

Les résultats obtenus pour les rats femelles sont présentés sur le graphe 89.

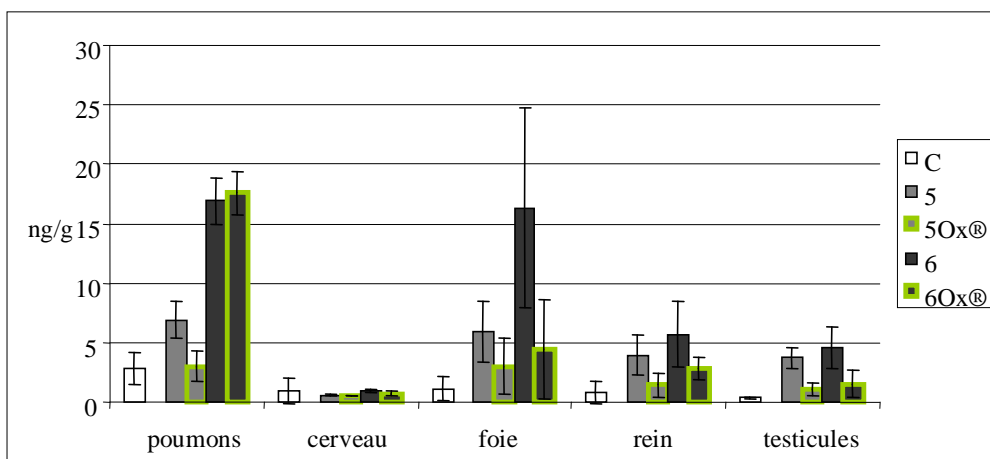


Graphe 89. Concentration en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).

Pour les rats femelles, la diminution de l'exposition dans les groupes 5Ox® et 6Ox®, suite à l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, se traduit par une réduction de la quantité d'OTA stockée dans les différents organes. Cette réduction, dans les groupes 5Ox® et 6Ox® respectivement, est de 66% et 68% au niveau pulmonaire, de 64% et 51% au niveau du cerveau, de 74% et de 66% au niveau hépatique et de 88% et 73% au niveau rénal. Il est intéressant de noter que la diminution du stockage est observée également au niveau du cerveau, organe dans lequel une quantité équivalente d'OTA est stockée quel que soit le niveau d'exposition des rats, quand ceux-ci reçoivent un blé contaminé en OTA, non traité par le procédé Oxygreen® (cf paragraphe 3.2.2.1).

Pour les rats femelles, le stockage dans les organes, au niveau rénal et hépatique, baisse proportionnellement plus que la réduction de la contamination en OTA du blé (70% et 50% respectivement pour les rats du groupe 5Ox® et 6Ox®). Cette réduction du stockage de l'OTA dans les organes, par rapport à l'exposition des rats, peut expliquer la concentration supérieure en OTA retrouvée au niveau sérique.

Les résultats concernant le stockage de l'OTA dans les poumons, le cerveau, le foie, les reins et les testicules des rats mâles sont présentés sur le graphe 90.



Graph 90. Concentration en OTA, exprimé en ng/g, dans les organes des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).

Pour les rats mâles, aucune modification du stockage n'est observée au niveau du cerveau suite à la diminution de l'exposition. La diminution de l'exposition, suite à l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, se traduit par une réduction de la quantité d'OTA stockée dans le foie, les reins, et les testicules. La réduction du stockage dans les groupes 5Ox® et 6Ox® respectivement, est de 49 et 73% au niveau hépatique, de 64 et 51% au niveau rénal, et 72 et 77% au niveau des testicules. Au niveau pulmonaire, on note une diminution du stockage, de 57%, uniquement dans le groupe 5Ox®.

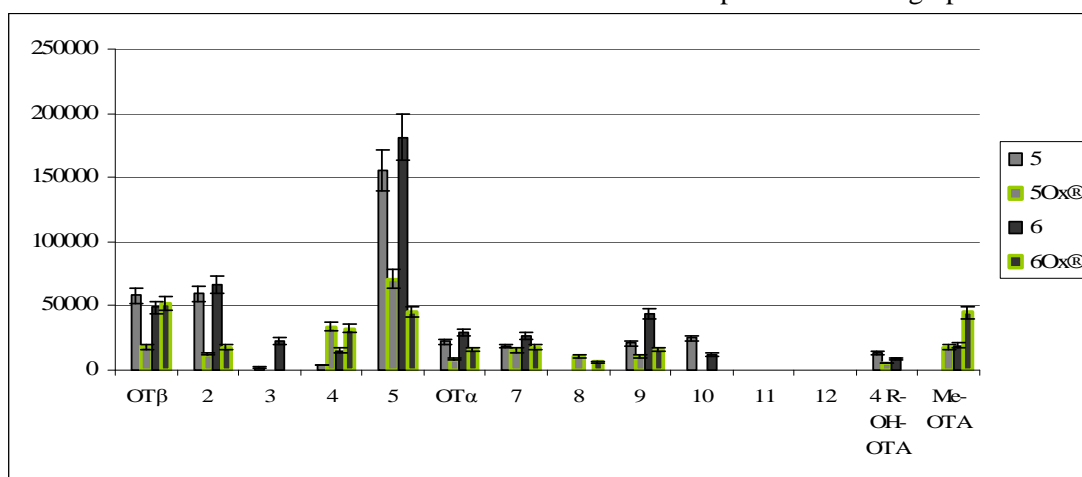
Pour les rats mâles, la diminution du stockage dans le groupe 5Ox® au niveau hépatique, et pulmonaire, est comparativement moins importante que la diminution de l'exposition. A l'inverse, la réduction du stockage pour le groupe 6Ox® au niveau hépatique, et au niveau des testicules est plus importante que celle de l'exposition.

Les modalités du stockage, dans les différents organes, diffèrent en fonction du sexe des rats.

4.2.2.2. Métabolisation dans les différents organes

4.2.2.2.1 Métabolisation au niveau hépatique

Les métabolites détectés dans le foie des rats femelles sont présentés sur le graph 91.

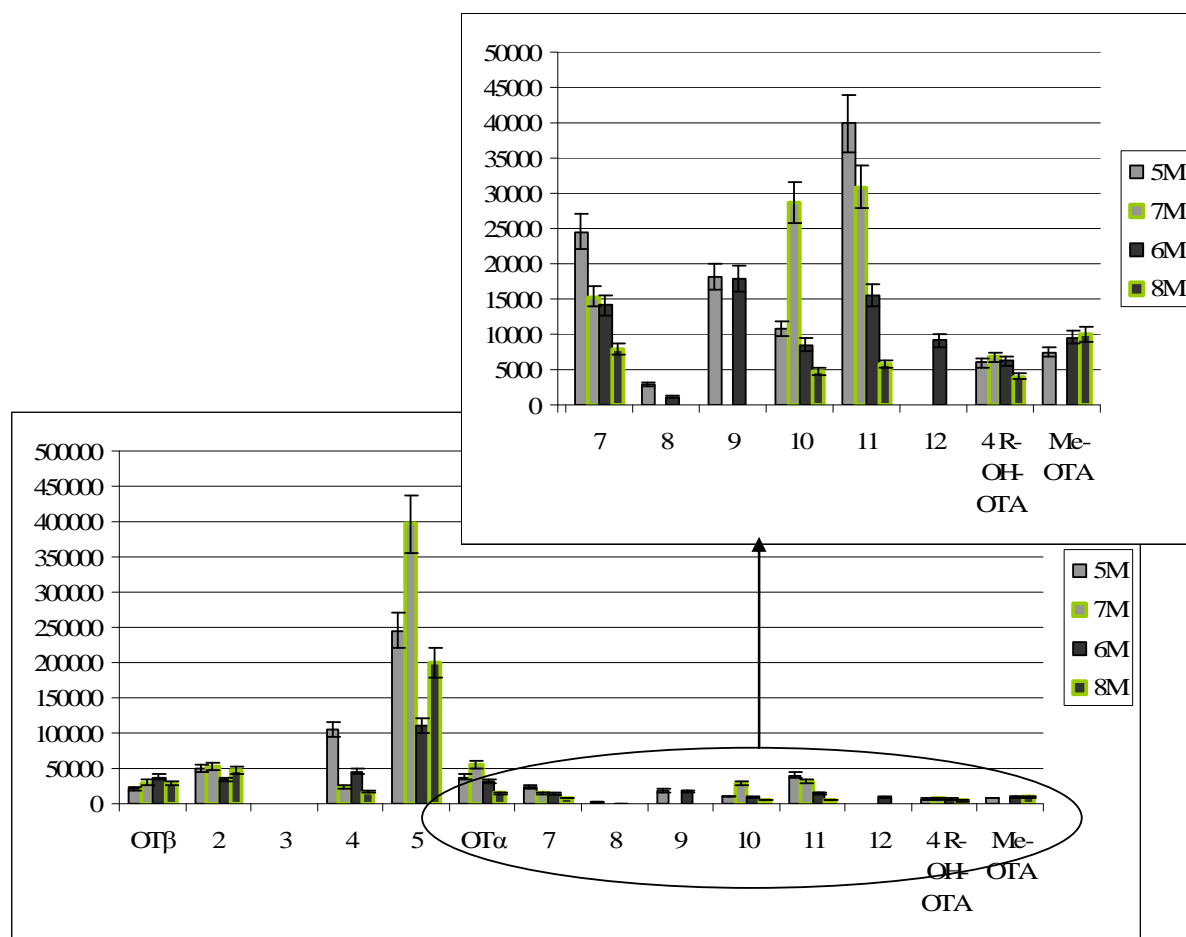


Graph 91. Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans le foie des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).

D'une façon générale, nous avons observé que la quantité de métabolites, dans le foie des rats femelles, augmente quand l'exposition des rats à l'OTA augmente, à l'exception de la forme méthylée de l'OTA dont la quantité diminue (chapitre 3.2.2.2.2.1). Aucun nouveau métabolite n'est détecté dans le foie des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (le métabolite 8 était précédemment détecté dans le foie des rats femelles exposées à des doses plus faibles en OTA, cf chapitre 3.2.2.2.2.1). La réduction du niveau d'exposition des rats, suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé, se traduit d'une façon générale par une diminution de la quantité des métabolites majoritaires (métabolites n°2, et n°5), ainsi que de la forme 4-R-OH-OTA. Les métabolites n°3 et 10 disparaissent totalement. Les métabolites n°4, 8 et Me-OTA sont retrouvés en quantités supérieures dans les groupes recevant un blé artificiellement contaminé en OTA, et traité par le procédé Oxygreen® (groupes 5Ox® et 6Ox®), par rapport aux groupes recevant un blé non traité (groupes 5 et 6).

La quantité d'OTβ, détectée dans le foie de rats exposés à des doses croissantes d'OTA, augmente avec l'exposition à l'OTA jusqu'à un plateau atteint pour le groupe 5 (cf paragraphe 3.2.2.2.2.1). Il est intéressant de noter que l'application du procédé Oxygreen® sur le blé contaminé à 100µg/kg abaisse l'exposition des rats du groupe 6Ox® à un niveau équivalent à celui des rats du groupe 5 : la quantité d'OTβ retrouvée dans le foie des rats femelles des groupes 5, 6Ox®, et 6 est équivalente, et correspond à la valeur « plateau ». Pour une contamination du blé en OTA plus faible (groupe 5), la diminution de l'exposition à l'OTA par le procédé Oxygreen® des rats du groupe 5Ox®, se solde par une diminution de la quantité d'OTβ.

Les métabolites détectés dans le foie des rats mâles sont présentés sur le graphe 92.



Graphe 92. Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans le foie des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).

D'un point de vue qualitatif, on n'observe pas de nouveau métabolite dans le foie des rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®. Nous constatons la disparition complète de trois métabolites (n°8, 9 et 12) dans le foie des rats mâles recevant un blé contaminé en OTA, et traité par le procédé Oxygreen®.

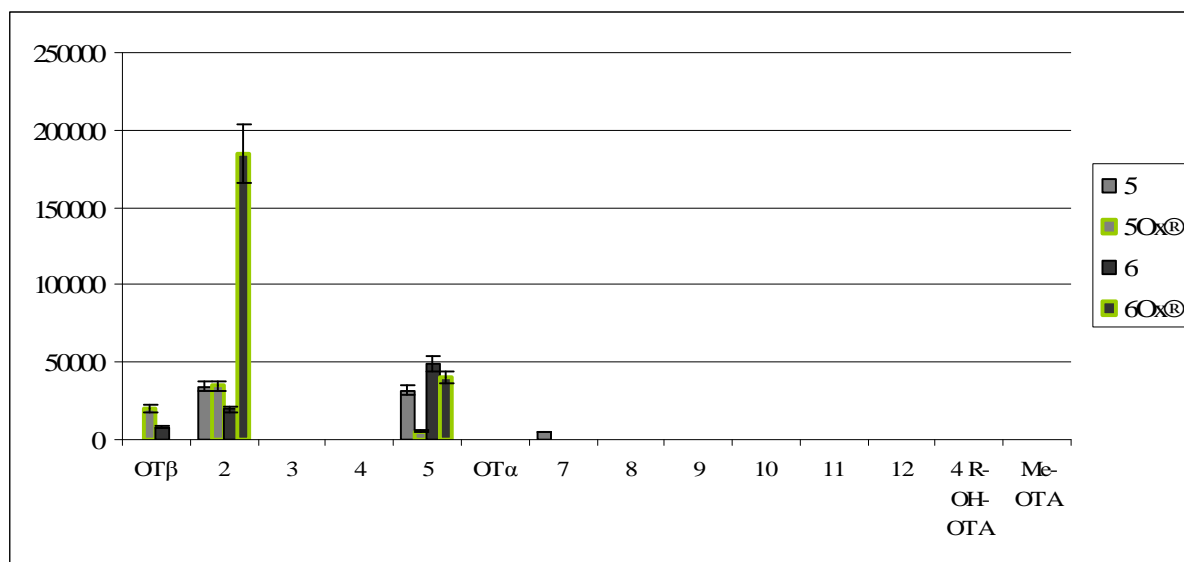
Pour les métabolites n°4, 7, 11, la diminution de l'exposition des rats par le traitement Oxygreen®, conduit à la réduction de la quantité de ces métabolites. L'effet « en cloche », observé pour les métabolites 4 et 11 dans le foie des rats recevant un blé contaminé en OTA, est également observé pour les rats recevant un blé ozoné. Les métabolites, 2 et 5, sont formés en quantité plus importante dans le foie des rats mâles recevant un blé ozoné.

Les deux métabolites de l'OTA ayant perdu la phényl alanine, l'OTβ et l'OTα, évoluent de façon contraire en fonction du niveau de contamination en OTA du blé traité par le procédé Oxygreen®. En effet, leur concentration est augmentée dans le foie des rats du groupe 5Ox®, recevant le blé initialement contaminé à 40μg/kg et traité par le procédé Oxygreen®, alors que celle-ci est diminuée dans le foie des rats du groupe 6Ox®, recevant le blé initialement contaminé à 100μg/kg et traité par le procédé Oxygreen®. Ceci montre que la formation de ces deux métabolites ne dépend pas linéairement de l'exposition à l'OTA. Les enzymes, conduisant à la formation de ces deux dérivés, ayant perdu la phénylalanine, doivent être tantôt activées, tantôt inhibées en fonction de la dose d'exposition à l'OTA.

Quand on compare l'évolution de la concentration des différents métabolites dans les groupes recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, en fonction du sexe, on constate en général un effet inversé chez les mâles et les femelles. Ainsi, la formation des métabolites 2 et 5 est diminuée chez les femelles, alors qu'elle est stimulée chez les rats mâles. Le métabolite n°4 augmente, en relation avec l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, chez les rats femelles, alors qu'il diminue chez les rats mâles. De même, l'évolution de la concentration en OTβ et en OTα suit une évolution inversée chez les mâles et les femelles.

4.2.2.2.2 Métabolisation au niveau rénal

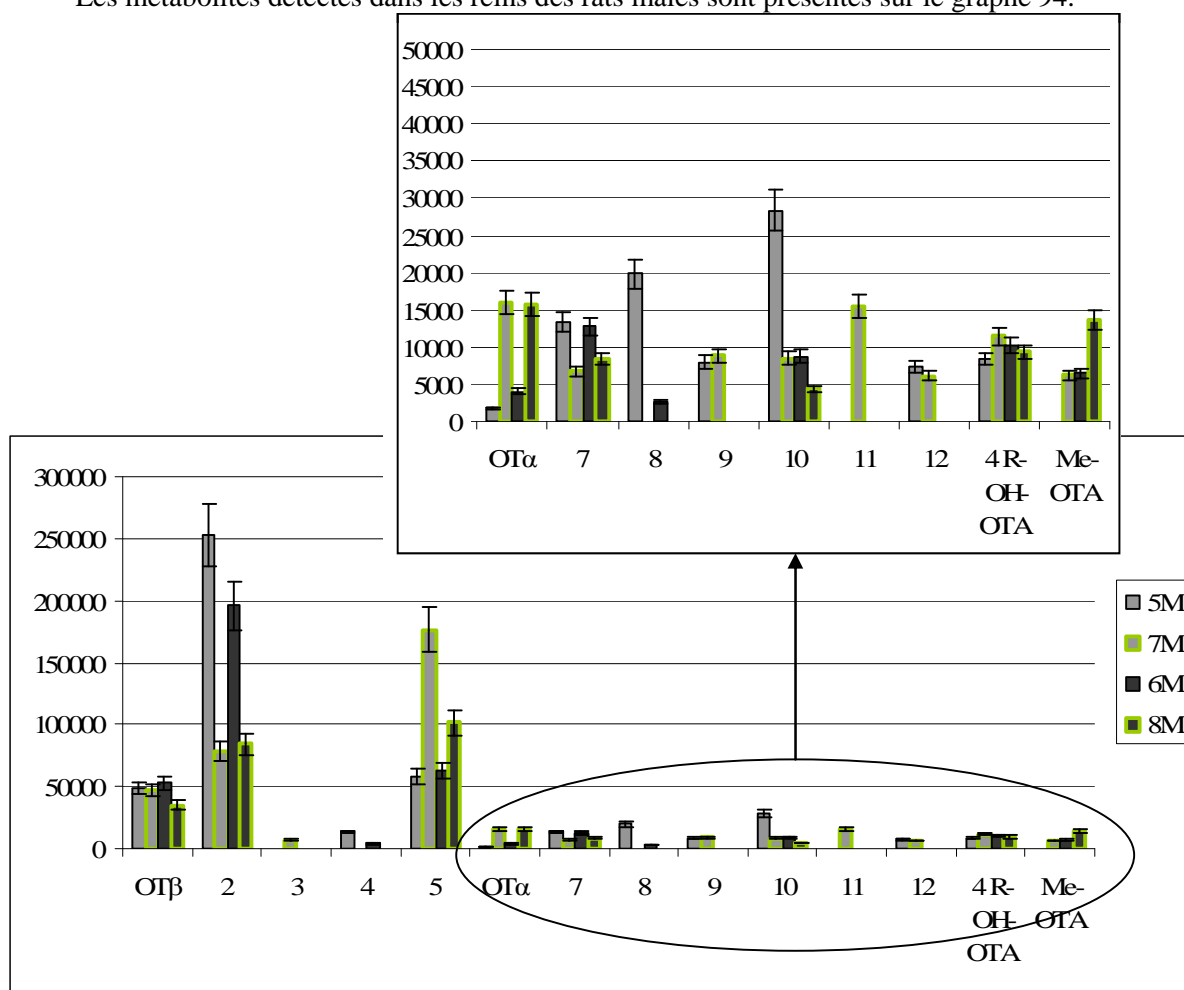
Les métabolites détectés dans les reins des rats femelles sont présentés sur le graphe 93.



Graphe 93. Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans les reins des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).

Aucun nouveau métabolite n'est détecté dans le rein des rats femelles, recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®. On observe une diminution significative de la quantité de métabolite n°5 dans le rein des rats femelles du groupe 5Ox®, recevant le blé initialement contaminé 40µg/kg et traité par le procédé Oxygreen®. Le métabolite n°2 est fortement augmenté dans le groupe 6Ox®, recevant un lot de blé initialement contaminé à 100µg/kg et traité par le procédé Oxygreen®, alors qu'aucune variation de ce métabolite n'est observée dans le groupe 5Ox®. Nous avons observé que la quantité de métabolite n°2 suivait une évolution « en cloche » dans le rein des rats femelles exposées à l'OTA (cf paragraphe 3.2.2.2.2.2). L'application du procédé Oxygreen® réduit l'exposition des rats vers des doses où la quantité de métabolite n°2 stockée dans le rein est supérieure.

Les métabolites détectés dans les reins des rats mâles sont présentés sur le graphe 94.



Graphe 94. Concentration relative en métabolites, exprimée en surface de pic détecté à l'HPLC, dans les reins des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (cadre extérieur vert), ou non traité (cadre extérieur noir).

D'un point de vue qualitatif, pour les rats mâles, on observe l'apparition des métabolites n°3 et 11 chez les rats recevant un lot de blé traité par le procédé Oxygreen®, métabolite précédemment identifié dans le rein des rats mâles du groupe 3. A l'inverse, les métabolites n°4 et n°8 ne sont plus détectés dans ces mêmes groupes de rats.

D'un point de vue quantitatif, on détecte systématiquement plus d'Ota chez les rats recevant le lot de blé traité par le procédé Oxygreen®.

En ce qui concerne les métabolites 2, et 10, leur quantité est diminuée dans les groupes de rats recevant un blé contaminé en OTA, et traité par le procédé Oxygreen®, pour atteindre une quantité équivalente en ces métabolites indépendamment de l'exposition des rats (groupes 5Ox® et 6Ox®).

La comparaison de la métabolisation au niveau rénal, en relation avec l'application du procédé Oxygreen®, et en fonction du sexe, fait apparaître un comportement inversé entre mâles et femelles, et comparable à celui observé au niveau hépatique. La formation du métabolite n°2 est stimulée chez les rats femelles, alors qu'elle est inhibée pour les rats mâles. A l'inverse, la formation du métabolite n°5 est inhibée pour les rats femelles alors qu'elle est induite pour les rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®.

Alors qu'au niveau hépatique, l'exposition à un blé traité par le procédé Oxygreen® conduit globalement à la réduction de la majorité des métabolites, au niveau du rein la formation de plusieurs métabolites est amplifiée.

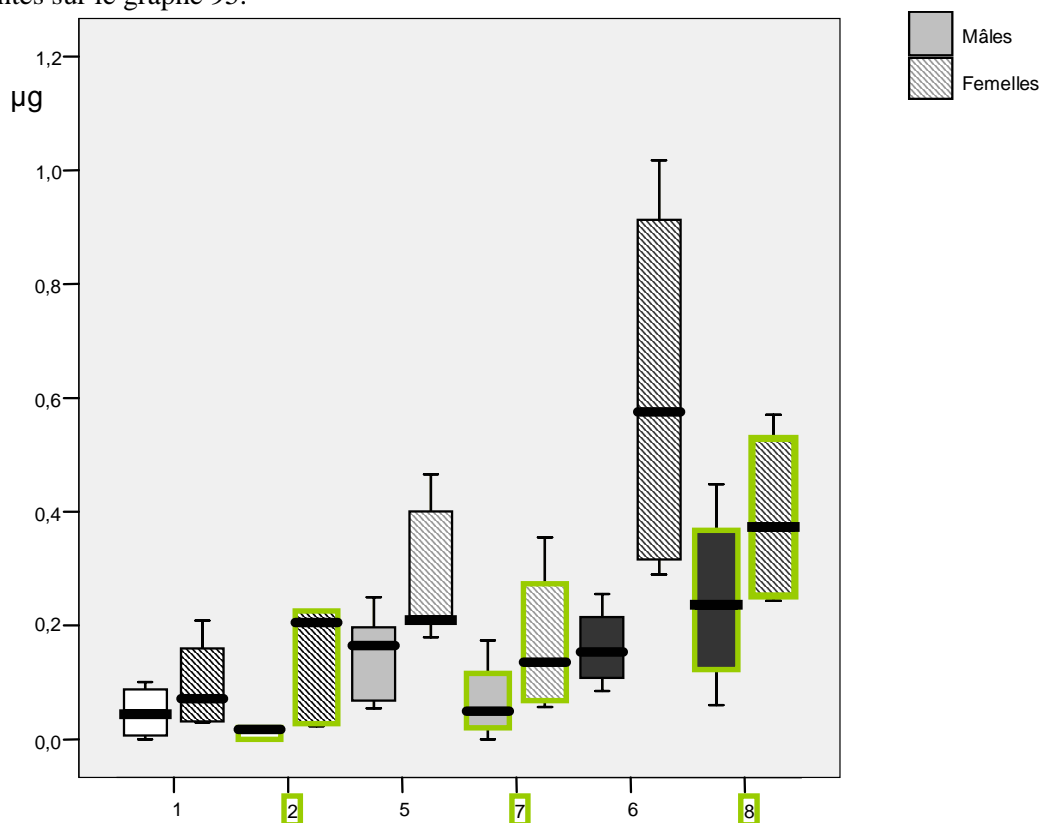
Ces résultats confirment que la métabolisation de l'OTA diffère en fonction du sexe et de l'organe, ceci étant lié à des différences concernant les mécanismes mis en jeu pour la transformation de l'OTA, ainsi que les seuils d'activation/d'inhibition de ces enzymes.

4.2.3 Excrétion urinaire de l'OTA et de ses métabolites

4.2.3.1 Elimination urinaire de l'OTA

Comme au chapitre 3.2.3, nous avons choisi de représenter la quantité cumulée d'OTA excrétée par voie urinaire, car une très forte variabilité en fonction des individus et en fonction du temps, est observée concernant l'élimination de l'OTA. Pour cela, nous avons cumulé l'excrétion urinaire d'OTA déterminée sur chaque prélèvement hebdomadaire des urines de 24 heures.

Les résultats obtenus, pour les rats mâles (boîtes pleines) et femelles (boîtes hachurées) sont présentés sur le graphe 95.



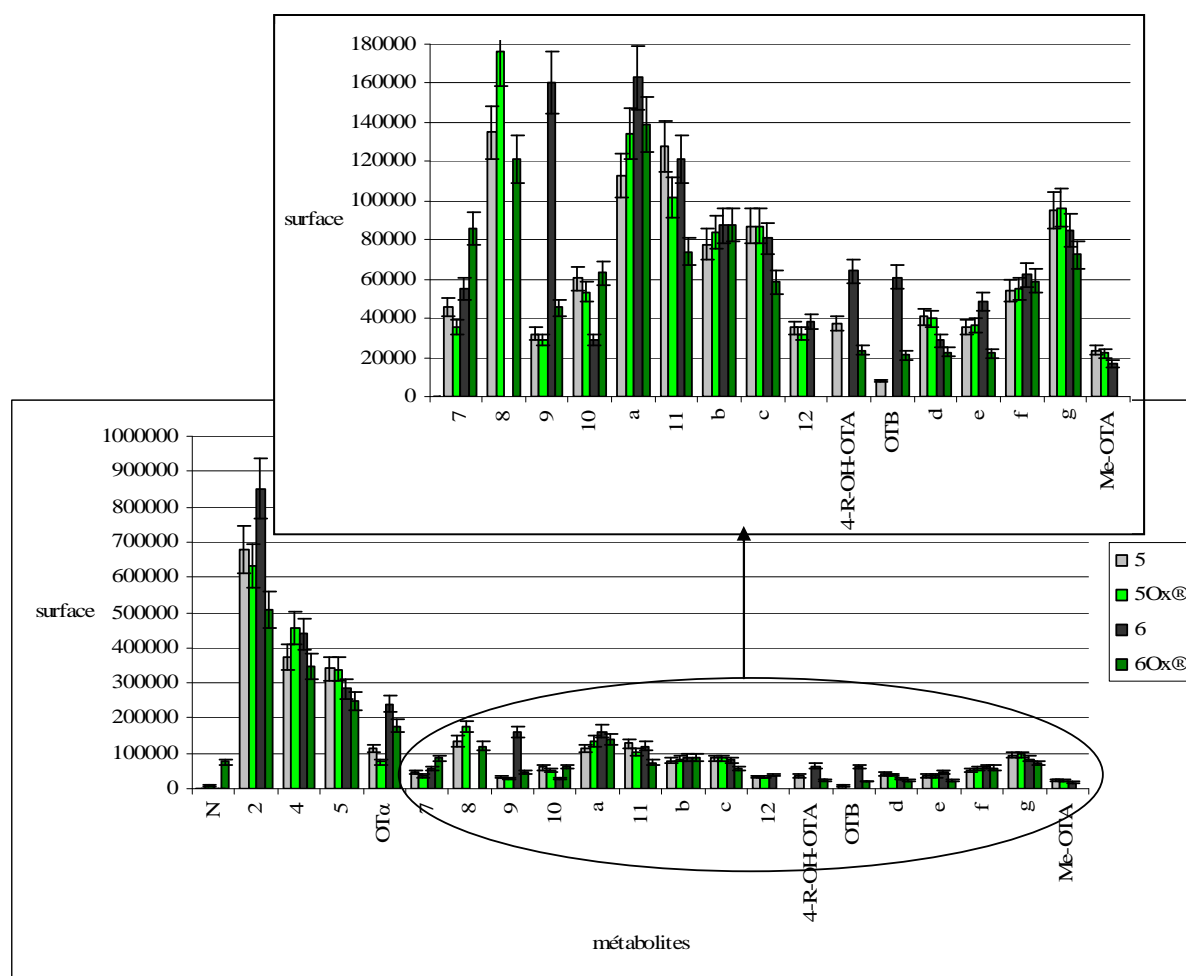
Graphe 95. excrétion urinaire d'OTA, exprimée en µg, dans les urines des rats mâles (boîtes pleines) et femelles (boîtes hachurées) recevant un blé traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert) ou non traité (cadre extérieur noir).

Les rats femelles et mâles du groupe 5Ox®, recevant le blé initialement contaminé à 40µg/kg et traité par Oxygreen®, excrètent dans les urines des quantités d'OTA qui sont très légèrement inférieures à celles excrétées par les rats des groupes 5. Cependant, cette diminution n'est pas significative.

Pour les rats femelles du groupe 6Ox®, contrairement à ce observé pour les mâles du même groupe 6Ox®, nous observons une légère diminution de l'excrétion urinaire d'OTA, celle-ci étant comparable à celle du groupe 5, exposé à la même dose d'OTA *via* un blé non traité par le procédé Oxygreen®. Ceci confirme que l'excrétion urinaire de l'OTA diffère entre mâles et femelles. La diminution de l'excrétion étant négligeable, voire inexistante, la relative augmentation du taux d'OTA sanguin, observé chez les rats femelles exposées à l'OTA *via* un blé traité par le procédé Oxygreen®, ne peut pas être expliqué par une baisse de l'élimination urinaire.

4.2.3.1 Elimination urinaire des métabolites de l'OTA

Les métabolites de l'OTA ont été séparés sur le gradient « Faucet-Marquis » et les résultats obtenus pour les rats femelles sont présentés sur le graphe 96.



Graphe 96. quantité relative en métabolites de l'OTA détectés dans les urines des rats femelles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (histogrammes verts) ou non traité par Oxygreen® (histogrammes gris).

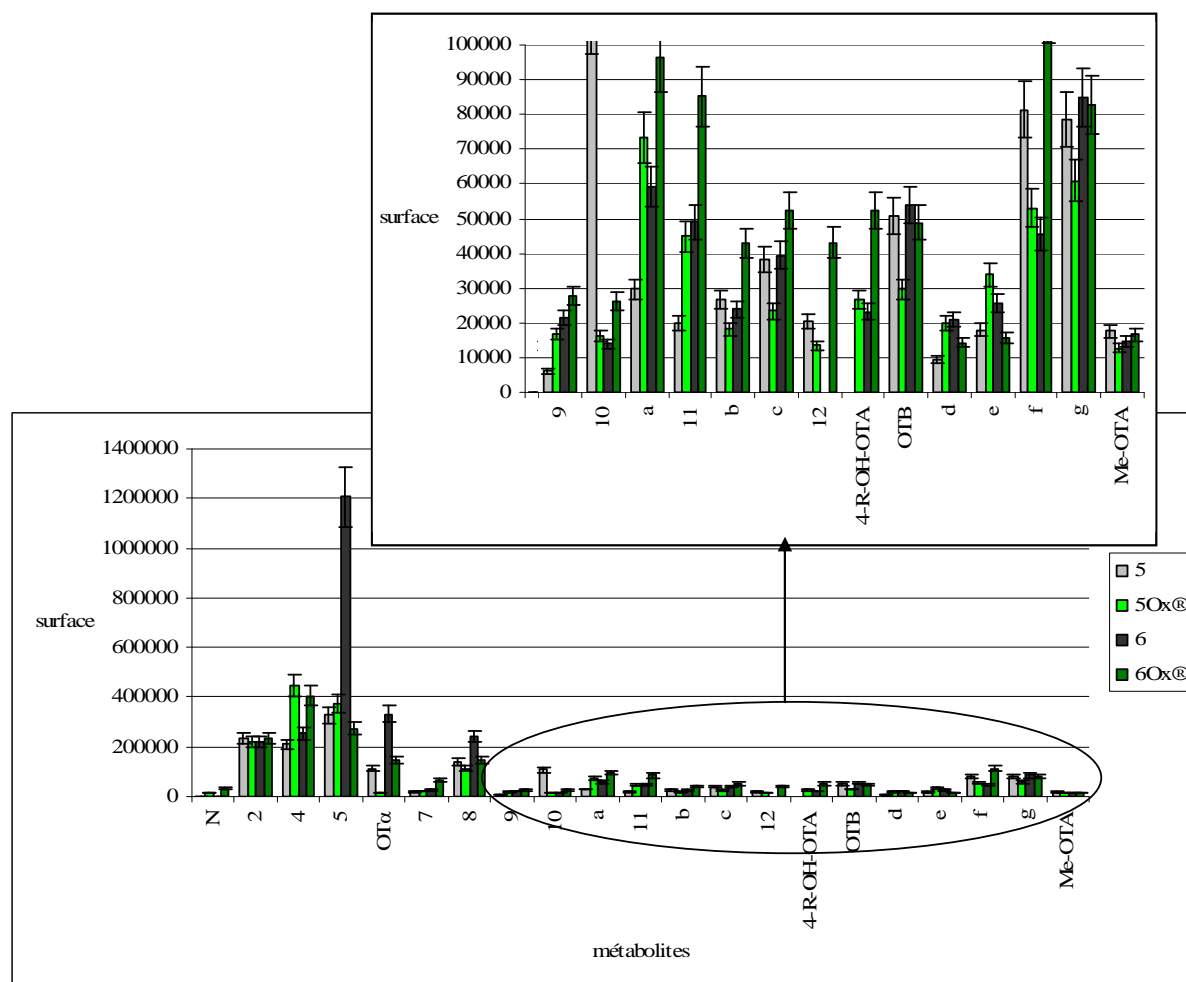
D'un point de vue qualitatif, on détecte dans les urines des rats mâles et femelles des rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, un nouveau métabolite, identifié par la lettre « N », et ayant un temps de rétention de 6,5 minutes sur ce gradient et qui augmente en fonction de la dose d'exposition à l'OTA. Ce métabolite n'est pas détecté dans les organes des rats. Celui-ci est plus

hydrophile que tous les autres métabolites détectés dans les urines ; il est sans doute plus rapidement éliminé, ce qui explique que l'on ne le retrouve pas dans les organes.

L'élimination urinaire des métabolites 2, Ota, n°9, 11, c (10-OH-OTA), 4-R-OH-OTA, OTB, e et g, est diminuée, ou non modifiée, suite à la diminution de l'exposition des rats femelles à l'OTA, par le traitement Oxygreen® (groupe 5 *versus* 5Ox® et groupe 6 *versus* 6Ox®). A l'inverse, l'élimination des métabolites 8 et N augmente, et ce d'autant plus, que le niveau de contamination en OTA du blé traité par le procédé Oxygreen® est élevé. Le métabolite n°4, ainsi que le métabolite n°8, absents du rein des rats femelles, sont retrouvés dans les urines et sont donc très rapidement éliminés.

A exposition équivalente (groupe 5 *versus* 6Ox®), l'excrétion urinaire des métabolites Ota, 7, 9 et OTB, est supérieure dans les groupes de rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®. A l'inverse, l'excrétion urinaire des métabolites 2, 11, c (10-OH-OTA), 4-R-OH-OTA, 12 (4-S-OH-OTA), d (OTHQ), et e, est nettement inférieure dans le groupe 6Ox®. En ce qui concerne les métabolites 4, 8, 9, 10, a, b (OP-OA), f, et g, la quantité excrétée dans les urines des rats est équivalente entre ces deux groupes 5 et 6Ox®, exposés à une dose comparable en OTA. Ainsi, pour une même dose d'exposition, l'excrétion urinaire de certains métabolites est augmentée quand les rats reçoivent un blé traité par le procédé Oxygreen®, alors que l'excrétion d'autres métabolites est diminuée.

Les résultats obtenus pour les rats mâles sont présentés sur le graphe 97.



Graph 97. quantité relative en métabolites de l'OTA détectés dans les urines des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (histogrammes verts) ou non traité par Oxygreen® (histogrammes gris).

Pour les rats mâles, la diminution de l'exposition des rats par le traitement Oxygreen® se solde par une diminution de l'excrétion des métabolites Ota, n°8 et n°10 (groupe 5 *versus* 5Ox® et groupe 6 *versus* 6Ox®). L'élimination des métabolites est augmentée pour les métabolites N, 4, 7 (uniquement dans le groupe 6Ox®), 9, a, 11, 12 (uniquement dans le groupe 8), 4-R-OH-OTA, et f (uniquement dans le groupe 6Ox®). L'élimination du métabolite 5 est favorisée dans le groupe 2, alors qu'elle est réduite dans les groupes recevant un blé artificiellement contaminé en OTA et traité par le procédé Oxygreen®.

A exposition égale (groupe 5 *versus* 6Ox®), l'excrétion urinaire des métabolites 4, 7, 9, a, 11, b (OP-OA), 12 (4-S-OH-OTA), 4-R-OH-OTA, et f, est nettement supérieure dans les groupes de rats exposés à un blé traité par le procédé Oxygreen® (groupe 6Ox®). Seule, la quantité de métabolite n°10, est réduite pour les rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®. Il est à noter que l'application du traitement Oxygreen® semble favoriser l'élimination de l'OTA sous forme de métabolites dans les urines de rats mâles.

4.2.4 Conclusions concernant la toxicocinétique de l'OTA résiduelle

Le traitement Oxygreen®, appliqué sur un blé contaminé en OTA, permet d'en réduire le niveau de contamination. Ceci se traduit par une réduction équivalente de l'exposition des animaux, ainsi que par une diminution de la quantité d'OTA sérique, et de celle stockée au niveau rénal et hépatique. Pour les rats femelles, la concentration en OTA dans les organes diminue proportionnellement plus que la simple diminution de l'exposition à l'OTA. Par contre, la concentration sérique en OTA diminue proportionnellement moins que la diminution de l'exposition pour la dose moyenne d'exposition (groupe 5 *versus* 5Ox®). Le déstockage de l'OTA à partir des organes ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'élimination : ceci explique l'élévation du taux d'OTA sanguin chez les femelles. A l'inverse, chez les rats mâles, la réduction du stockage dans les organes diminue proportionnellement moins que la diminution de l'exposition. Ceci ne peut pas être expliqué par une modulation de l'excrétion urinaire, mais s'explique par une variation des paramètres de stockage/déstockage de l'OTA dans les organes.

L'incidence de l'application du procédé Oxygreen® sur la métabolisation de l'OTA, et sur l'excrétion urinaire de ses métabolites est présentée ci-dessous. Nous avons comparé la formation et l'élimination de ces différents métabolites :

- suite à la diminution de l'exposition des rats à l'OTA par le procédé Oxygreen®, soit en comparant les groupes 5 *versus* 5Ox® et 6 *versus* 6Ox® (colonne↓ expo)

- chez les rats exposés à une dose équivalente d'OTA, 3500µg/kg pc/jour, *via* un blé non traité ou *via* un blé traité par le procédé Oxygreen®, soit en comparant les groupes 5 et 6Ox® (colonne expo =).

Métabolites/ tps rétention	Foie ♂		Foie ♀		Reins ♂		Reins ♀		urine ♂		Urine ♀	
	↓ expo	Expo =	↓ expo	Expo =	↓ expo	Expo =	↓ expo	Expo =	↓ expo	Expo =	↓ expo	Expo =
OTβ/ 8, 5min	↑↓	≥	↓	=	↓	≤	↑↓	=	∅		∅	
2 / 10,2 min	↑	=	↓	≤	↓	≤	↑	≥	=	=	↓	≤
3 / 11,3 min	∅		↓	≤	↑	=	∅		∅		∅	
4 / 13,8 min	↓	≤	↑	≥	↓	≤	∅		↑	≥	↑↓	=
5 / 15,5 min	↑	=	↓	≤	↑	≥	↓	=	↓	≥	=	=
OTα/ 18,4 min	↑↓	≤	↓	≤	↑	≥	∅		↓	=	↓	≥
7/ 20,1 min	↓	≤	↓	=	↓	≤	↓	≤	↑	≥	↓↑	≥
8/ 21,9 min	↓	≤	↑	≥	↓	≤	∅		↓	=	↑	=
9/23,3 min	↓	≤	↓	=	=	=	∅		↑	≥	↓	≥
10/ 25,4 min	↑↓	≤	↓	≤	↓	≤	∅		↑↓	≤	↑	=
a / 26,8 min	loq		loq		loq		∅		↑	≥	↓↑	≥
11/ 27,9 min	↓	≤	loq		↑	=	∅		↑	≥	↓	≤
b(OP-OA)/ 28,5 min	loq		loq		loq		∅		↑	≥	=	=
c 10-OH-OTA / 29,6 min	=	=	∅		=	≤	∅		↑↓	≥	↓	≤
12 4-S-OH-OTA / 30,8 min	↓	=	loq		=	=	∅		↓↑	≥	↓	≤
4-R-OH-OTA / 32,1	↓	=	↓	≤	↑	=	∅		↑	≥	↓	≤
OTB / 33,4	loq		loq		loq		∅		↓	=	↓	≥
d (OTHQ ?) / 36	loq		loq		loq		∅		↑↓	=	=	≤
e /38,5	loq		loq		loq		∅		↑↓	=	↓	≤
f / 43	loq		loq		loq		∅		↑↓	≥	=	=
g / 46	loq		loq		loq		∅		↓	=	=	≤
Me-OTA/ 56 min	↓	≥	↑	≥	↑	≥	∅		=	=	↓	≤

↑ : la quantité de métabolites est supérieure ou égale dans le groupe recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®

↓ la quantité de métabolites est inférieure ou égale dans le groupe recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®

↑↓ la quantité de métabolites est tantôt supérieure, tantôt inférieure, dans le groupe recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®

≤ à même exposition, la quantité de métabolite est inférieure dans le groupe recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®

≥ à même exposition, la quantité de métabolite est supérieure dans le groupe recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®

tableau 29. récapitulatif des variations observées, concernant la quantité de métabolites détectée dans le foie, les reins et les urines de rats, suite à la diminution de l'exposition des rats (groupe 5 versus groupe 5Ox® et groupe 6 versus groupe 6Ox®) et quand les rats sont exposés à une même dose d'OTA via un blé traité ou non par Oxygreen® (groupe 5 versus groupe 6Ox®).

Concernant la métabolisation au niveau des deux principaux organes (foie et rein), on observe des modifications de la métabolisation, en fonction du sexe des rats et en fonction du type de blé reçu (traité ou non par le procédé Oxygreen®). La diminution de l'exposition des rats à l'OTA ne se traduit pas systématiquement par une diminution de la quantité de ses métabolites dans les organes. Il est à noter, qu'à exposition égale, et ceci pour la plupart des métabolites, la quantité de métabolites stockés dans les organes est inférieure ou égale pour les rats recevant un blé traité par le procédé, et ceci tant

au niveau rénal qu'hépatique. Ceci peut être mis en parallèle avec l'augmentation de l'excrétion de ces métabolites dans les urines des rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, ceci étant particulièrement visible chez les rats mâles.

La concentration de certains métabolites est par contre augmentée dans les organes des rats, ce qui peut être mis en parallèle avec une réduction de leur excrétion : ceci est observé pour les métabolites 5 et Ota, dont la quantité augmente dans le foie des rats mâles et dont l'excrétion est réduite.

Certains métabolites détectés dans le rein et le foie, tels que les métabolites OTβ et 3, ne sont pas retrouvés dans les urines. Leur absence dans les urines peut être liée au fait qu'ils sont éliminés très rapidement, ou/et qu'ils sont pris en charge par une autre voie d'excrétion. L'augmentation de la formation des métabolites, dans les organes des rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, résulte vraisemblablement d'une induction des voies de métabolisation, et non pas, d'une diminution des capacités d'excrétion.

Il apparaît que les rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® ont, d'une façon générale, tendance à éliminer des quantités plus importantes de ces métabolites dans les urines, conduisant à une réduction de la quantité de métabolites stockés dans les organes : à exposition équivalente, la quantité de métabolites retrouvées dans le foie et les reins des rats est inférieure quand ceux-ci reçoivent un blé ozoné.

La modulation de l'élimination et celle de la métabolisation sont complexes et différent entre les rats mâles et les rats femelles.

4.3 Potentiel toxique de l'OTA résiduelle

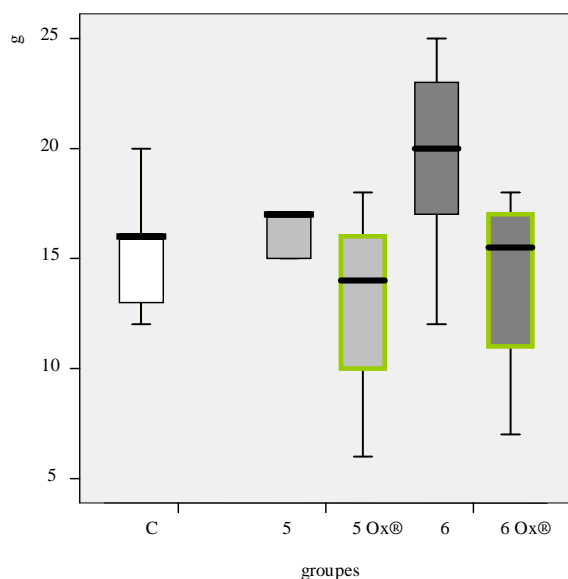
Nous nous sommes intéressé aux effets de la diminution de l'exposition des rats à l'OTA par le procédé Oxygreen® sur le potentiel toxique de la toxine résiduelle.

4.3.1 Toxicité générale : suivi des paramètres biologiques et physiologiques

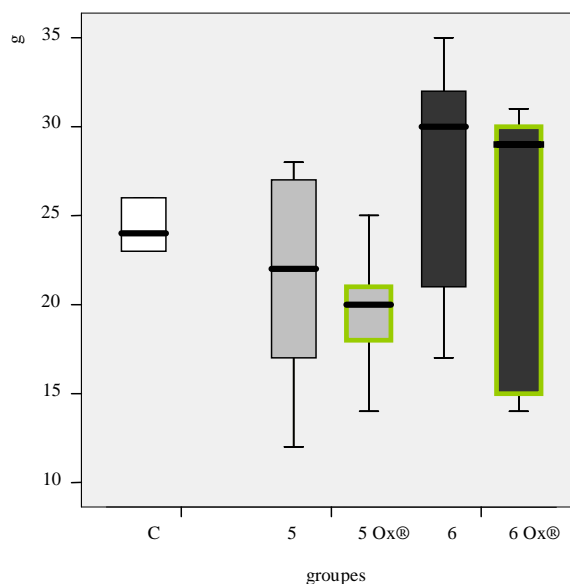
4.3.1.1 Evolution pondérale des rats

4.3.1.1.1 Gain de poids des rats

Le gain de poids des rats femelles et mâles a été suivi au cours des 28 jours de l'expérience pour les rats recevant un blé contaminé en OTA et traité ou non par le procédé Oxygreen®. Les résultats obtenus pour les rats femelles et mâles sont présentés sur les graphes 98 et 99.



Graph 98



graphe 99

Graph 98. gain de poids, exprimé en g, des rats femelles recevant un blé traité par Oxygreen® (cadre vert) ou non (cadre extérieur noir) au cours des 28 jours de traitement.

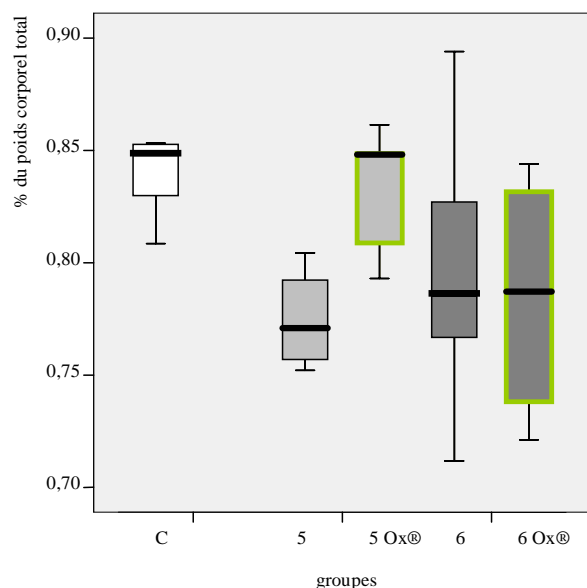
Graph 99. gain de poids, exprimé en g, des rats mâles recevant un blé traité par Oxygreen® (cadre vert) ou non (cadre extérieur noir) au cours des 28 jours de traitement.

Aucune différence significative n'est observée concernant le gain de poids des rats femelles et des rats mâles en relation avec l'application du procédé Oxygreen® sur le blé. De même, aucune modification de la prise d'aliment n'est notée. Par conséquent, l'application du procédé n'a pas d'incidence sur la valeur nutritive du blé.

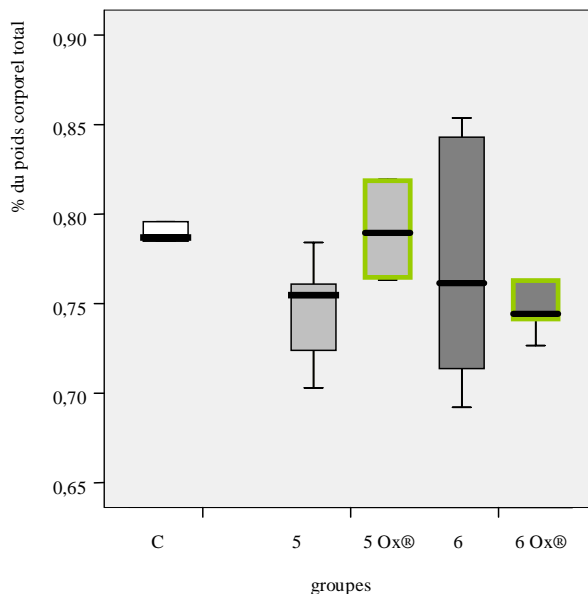
4.3.1.1.2 Poids des organes

4.3.1.1.2.1 Poids relatif des reins

Les résultats obtenus concernant le poids relatif du rein des rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 100



Graphe 101

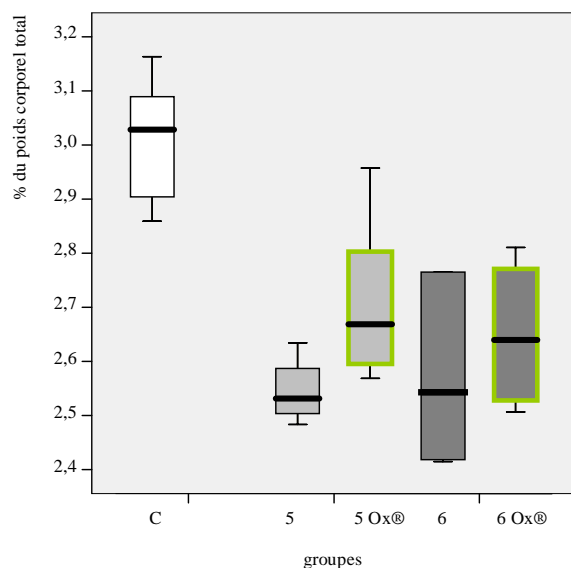
Graph 100. poids relatif des reins exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graph 101. poids relatif des reins exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

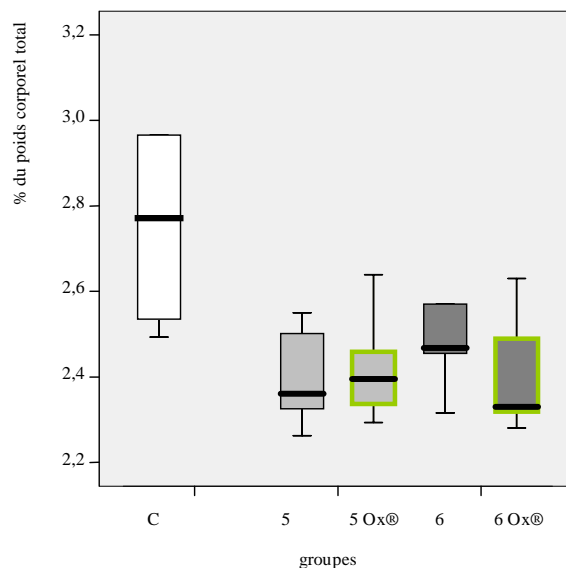
Nous avons constaté que l'exposition à l'OTA induit une atrophie rénale chez les rats femelles (cf paragraphe 3.3.1.1.2.1). La diminution, par le procédé Oxygreen®, du niveau de contamination en OTA du blé initialement contaminé à 40µg/kg, permet de rétablir le poids du rein des rats femelles et mâles du groupe 5OX®, à un poids équivalent à celui des rats du groupe de référence (groupe C). Ce rétablissement n'est pas observé au sein du groupe de rats femelles et mâles 6OX®, recevant le blé initialement contaminé à 100µg d'OTA/kg, et traité par le procédé Oxygreen®. Néanmoins, nous notons que le poids relatif du rein des rats des groupes 6OX® est équivalent à celui des rats des groupes 5, exposés à la même dose d'OTA *via* un blé non ozoné. Par conséquent, l'atrophie rénale observée résulte exclusivement de l'exposition à l'OTA des animaux.

4.3.1.1.2.2 Poids relatif du foie

La présence d'OTA dans le blé entraîne une réduction du poids relatif du foie pour les rats femelles et mâles (cf paragraphe 3.3.1.1.2.2). Les résultats obtenus avec les groupes de rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes suivants.



Graphe 102



graphe 103

Graphe 102. poids relatif du foie exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 103. poids relatif du foie exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

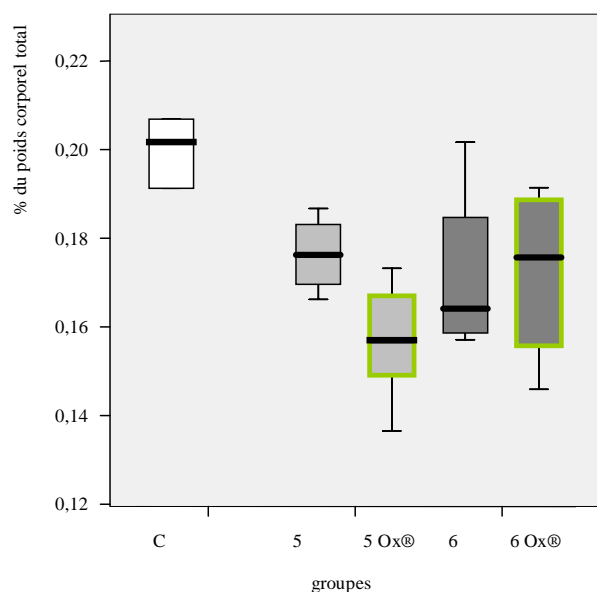
Chez les rats femelles, la diminution du niveau de contamination en OTA du blé par le traitement Oxygreen® permet de réduire l'atrophie hépatique des rats : les rats du groupe 5Ox®, recevant un blé contaminé initialement à 40µg/kg, et traité par le procédé Oxygreen®, ont un poids hépatique qui est supérieur à celui des rats du groupe 5, et plus proche du niveau des rats du groupe de référence (groupe C). Néanmoins, contrairement à ce qui était observé au niveau rénal, le poids relatif du foie reste inférieur à celui du groupe de référence.

Pour les rats mâles, la diminution de l'exposition des rats à l'OTA suite au traitement du blé par le procédé Oxygreen®, ne suffit pas à contrecarrer l'effet toxique lié à l'ingestion d'OTA.

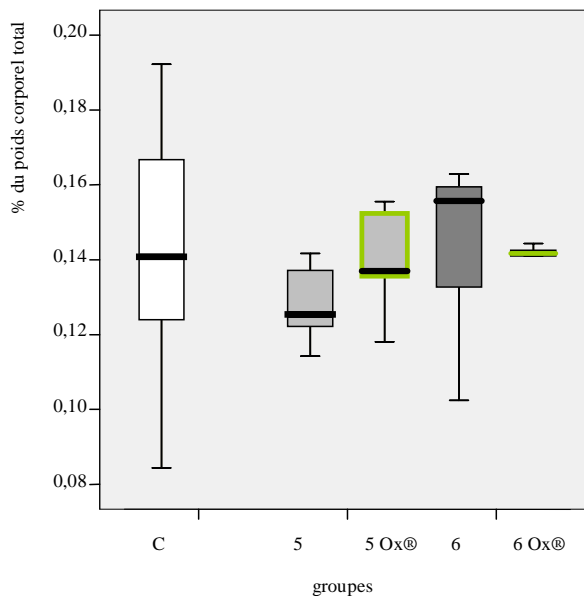
La diminution du niveau d'exposition des rats du groupe 6Ox®, suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé, ne permet pas non plus le rétablissement du poids relatif du foie à un niveau voisin de celui du groupe de référence. On note, qu'à exposition équivalente, les rats femelles et mâles des groupes 5 et 6Ox® ont un poids relatif hépatique comparable, indépendamment de l'application du traitement Oxygreen® sur l'aliment.

4.3.1.1.2.3 Poids relatif du thymus

L'exposition à l'OTA induit une régression du thymus pour les rats femelles, plus ou moins prononcée en fonction des groupes (cf paragraphe 3.3.1.1.2.3). Les résultats obtenus avec les groupes de rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés ci après.



Graphe 104



Graphe 105

Graphe 104. poids relatif du thymus exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 105. poids relatif du thymus exprimé en % par rapport au poids corporel total des rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Chez les rats mâles, le poids relatif du thymus ne varie pas que les animaux reçoivent un blé traité ou non par le procédé Oxygreen®.

Chez les rats femelles, le poids relatif du thymus des rats femelles recevant le blé traité par le procédé Oxygreen® (groupes 5Ox® et 6Ox®) ou non traité (groupes 5 et 6) est significativement inférieur à celui du groupe de référence.

La diminution du niveau de contamination en OTA du blé par le traitement Oxygreen® ne permet pas de réduire l'atrophie du thymus, voire l'amplifie (groupes 5Ox®). Cette amplification peut être expliquée en considérant le fait que l'atrophie du thymus la plus prononcée est observée, dans cette étude, au sein du groupe de rats femelles 3, exposées à 170ng/kg pc/jour (paragraphe 3.3.1.1.2.3 du chapitre 3). La diminution du niveau d'exposition des rats par le procédé Oxygreen®, abaisse le niveau d'exposition vers une dose à laquelle les effets de l'OTA sont plus marqués.

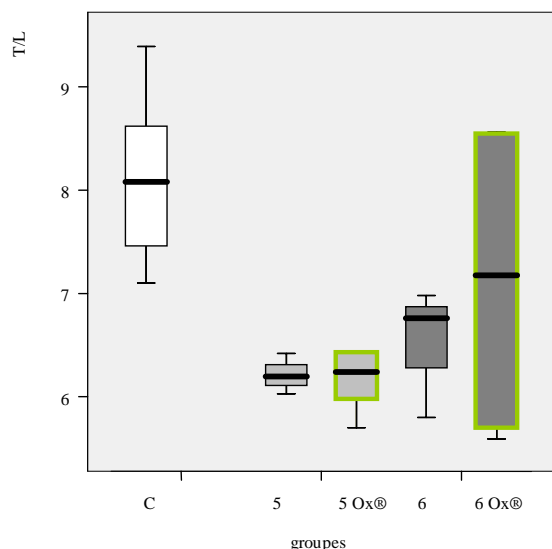
4.3.1.2.1 Hématologie

Il est à noter que certains des échantillons de sang des rats des groupes 5Ox® et 6Ox®, groupes recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, ainsi que des rats du groupe 6, recevant le blé contaminé au plus fort taux d'OTA, étaient coagulés, ne permettant pas de faire les analyses.

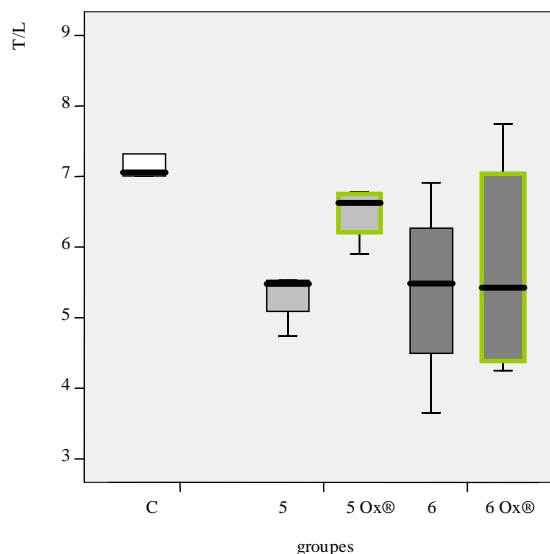
Par conséquent, pour les groupes de rats mâles 6, 5Ox® et 6Ox®, nous disposons de 4 valeurs individuelles par groupe. Nous disposons de 3 valeurs pour le groupe 6 de rats femelles, et de 5 valeurs pour les autres groupes.

4.3.1.2.1.1 Taux leucocytaire sanguin

L'exposition des rats femelles et mâles à l'OTA conduit à une diminution de la quantité de leucocytes dans le sang des rats exposés aux plus fortes doses (paragraphe 3.3.1.2.1.1). Les résultats concernant les rats femelles et mâles recevant les lots de blé traités par le procédé Oxygreen® sont présentés ci-dessous.



Graphe 106



Graphe 107

Graphe 106. taux de leucocytes sanguin, exprimé en T/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

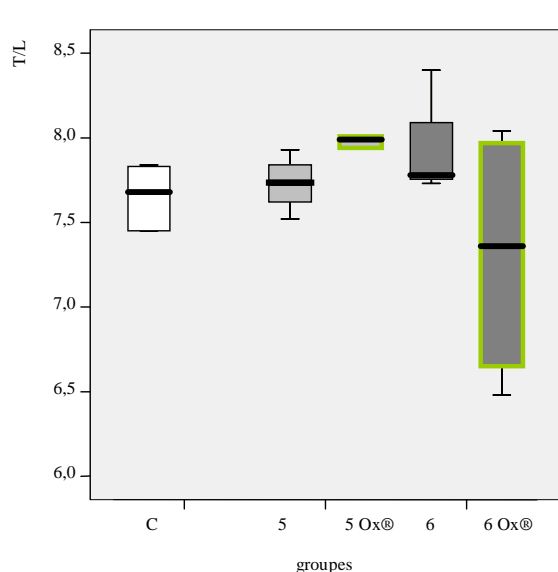
Graphe 107. taux de leucocytes sanguin, exprimé en T/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Chez les rats femelles, la diminution du niveau d'exposition des rats à l'OTA suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé, ne permet pas de ramener le taux leucocytaire sanguin des rats à un niveau équivalent à celui du groupe de référence (groupe C), ni même de contrecarrer cette baisse. Nous avons observé que, même des faibles doses d'exposition (groupe 4, 500ng/kg pc/jour, chapitre 3.3.1.2.1.1) conduisaient à une diminution du le taux leucocytaire sanguin des rats femelles. Les rats femelles du groupe 5OX® sont exposés à 730ng/kg pc, dose supérieure à celle pour laquelle nous observons une diminution du taux de leucocytes. Il est donc logique de ne pas observer une amélioration vis-à-vis de ce paramètre.

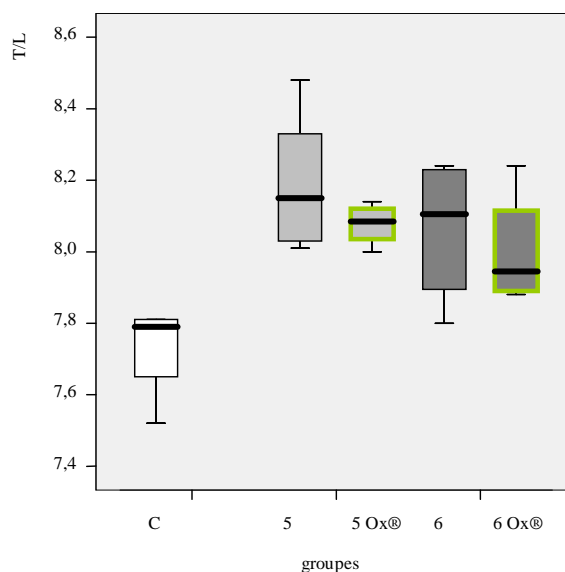
Contrairement à ce observé chez les rats femelles, la diminution de l'exposition des rats mâles, suite à l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, se traduit par une nette diminution de l'effet de l'OTA sur le taux sanguin en leucocytes (groupe 5OX® *versus* groupe 5) ; néanmoins, le taux leucocytaire reste inférieur à celui du groupe de référence. En ce qui concerne les groupes de rats mâles 6 et 6OX®, la diminution du niveau d'exposition des rats n'est pas suffisante pour rétablir un taux normal en leucocytes.

4.3.1.2.1.2 Taux érythrocytaire

L'exposition des rats à l'OTA a pour effet une augmentation du taux d'érythrocytes selon un effet en « cloche » (paragraphe 3.3.1.2.1.2). Les résultats obtenus suite à l'ingestion d'un blé traité par le procédé Oxygreen® par les rats femelles et mâles sont présentés ci-après.



Graphe 108



Graphe 109

Graphe 108. taux d'érythrocytes, exprimé en T/L, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 109. taux d'érythrocytes, exprimé en T/L, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Pour les rats femelles, l'exposition à l'OTA n'induit pas de variations significatives de la concentration en érythrocytes. Chez les rats femelles recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®, il est à noter que le taux d'érythrocytes des rats du groupe 5Ox® est supérieur à celui des rats du groupe 5 et à celui du groupe de référence (groupe C) : ceci s'explique par le fait que la baisse de l'exposition à l'OTA se rapproche de la concentration pour laquelle on a observé les effets les plus prononcés sur le taux d'érythrocytes (groupe 4, paragraphe 3.3.1.2.1.2). En ce qui concerne les rats femelles du groupe 6Ox®, on note une plus grande dispersion des résultats que dans tous les autres groupes. De ce fait, aucune différence significative n'est observée entre les groupes 1, 5, 6 et 6Ox®.

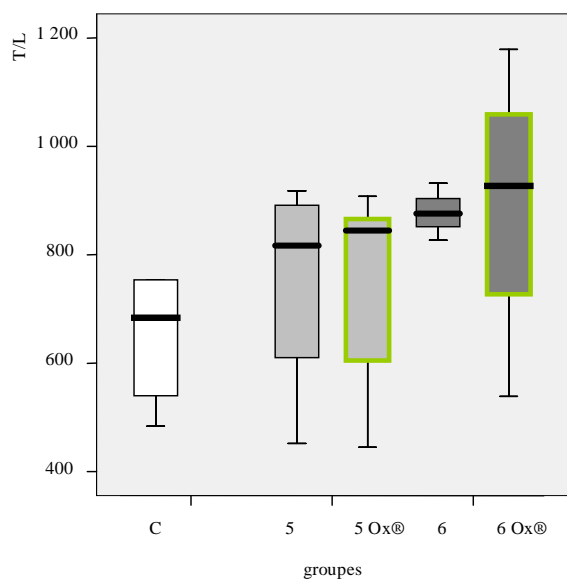
Pour les rats mâles, l'exposition à l'OTA induit une augmentation nette de la concentration en érythrocytes. La diminution de l'exposition de animaux par le procédé Oxygreen® n'est pas suffisante pour que l'on n'observe plus les effets de l'OTA sur ce paramètre (groupes 5 *versus* 5Ox® et groupes 6 *versus* 6Ox®).

4.3.1.2.1.3 Facteurs de la coagulation

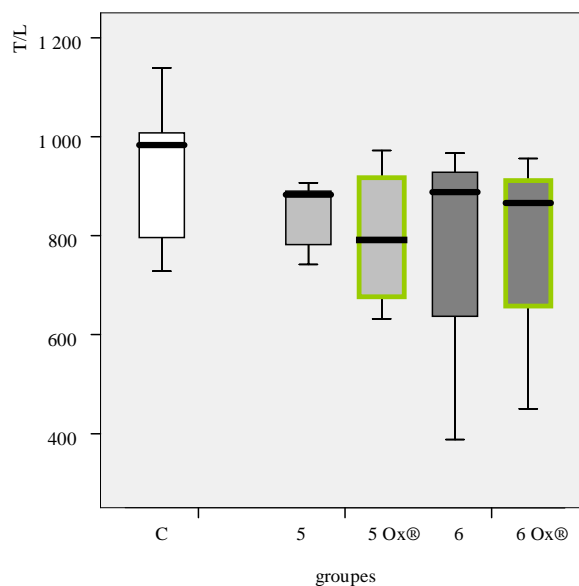
- **Concentration en plaquettes**

L'exposition des rats à l'OTA entraîne une augmentation du taux de plaquettes chez les rats femelles (paragraphe 3.3.1.2.1.3).

Les résultats concernant les groupes de rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés ci-dessous.



Graphe 110



Graphe 111

Graphe 110. taux plaquettaire sanguin, exprimé en T/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 111. taux plaquettaire sanguin, exprimé en T/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

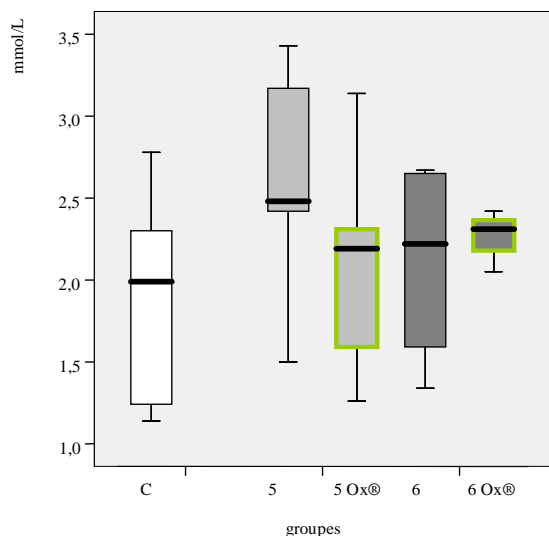
Pour les rats femelles, la diminution de l'exposition des rats du groupe 6 ne permet pas de contrecarrer l'effet de l'OTA sur la concentration sanguine en plaquettes et augmente la dispersion des résultats. La concentration en plaquettes dans le sang des rats femelles des groupes 5 et 6Ox®, exposés à la même dose d'OTA via un aliment non traité ou traité par le procédé Oxygreen®, est équivalente. Par conséquent, l'effet sur la concentration plaquettaire des rats du groupe 6Ox® est exclusivement liée à la quantité d'OTA ingérée par les animaux.

En ce qui concerne les rats mâles, le taux plaquettaire n'est pas modifié que ceux-ci reçoivent un aliment traité ou non par le procédé Oxygreen®.

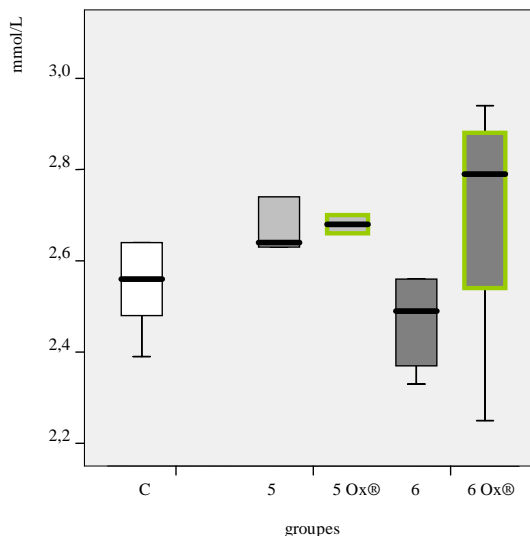
- **Concentration en fibrinogène**

L'exposition à l'OTA des rats conduit à une augmentation de la concentration sanguine en fibrinogène, selon un effet « en cloche », les mâles étant plus sensibles que les femelles (paragraphe 3.3.1.2.1.3).

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 112



Graphe 113

Graphe 112. Concentration sanguine en fibrinogène, exprimée en g/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 113. Concentration sanguine en fibrinogène, exprimée en g/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

La diminution de l'exposition à l'OTA des rats femelles du groupe 5, suite à l'application du procédé Oxygreen®, permet de rétablir une concentration normale en fibrinogène (groupe 5 versus groupe 5Ox®). Pour les groupes 6 et 6Ox®, la concentration en fibrinogène dans le sang des rats femelles est comparable à celle du groupe de référence (groupe C).

Contrairement à ce observé pour les femelles, pour les rats mâles, la diminution de l'exposition des rats suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé, ne permet pas d'annuler l'effet de l'OTA sur la concentration sanguine en fibrinogène. Nous avons observé l'effet le plus prononcé au sein des rats mâles du groupe 4 (paragraphe 3.3.1.2.1.3). Les rats du groupe 5Ox® sont exposés à une dose d'OTA de 730ng/kg pc/jour, relativement proche de celle du groupe 4 (500ng/kg pc/jour), ce qui explique que nous observons toujours l'effet toxique de l'OTA.

La concentration en fibrinogène dans le sang des rats du groupe 6Ox® a tendance à être supérieure à celle des rats du groupe 6 et est similaire à celle des animaux du groupe 5. Les groupes 5 et 6Ox® étant exposés à une dose équivalente d'OTA, il apparaît que l'application du procédé Oxygreen® sur le blé n'a pas d'incidence par lui-même sur la concentration en fibrinogène et que l'effet sur ce paramètre est directement lié à la dose d'exposition à l'OTA des animaux.

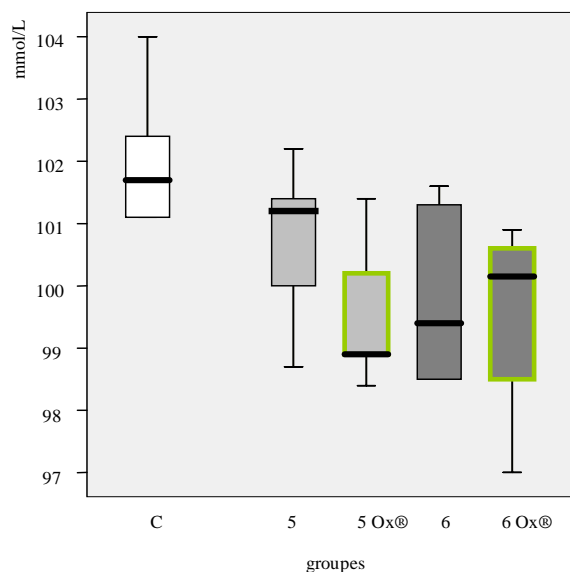
4.3.1.2.2 Biochimie sanguine

Les paramètres sanguins ont été déterminés sur tous les animaux de chacun des groupes, à l'exception des animaux morts en cours d'expérience.

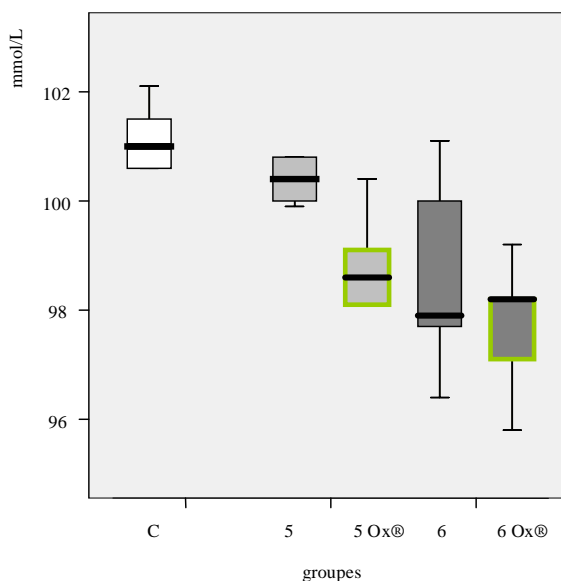
4.3.1.2.2.1 Concentration sanguine en électrolytes

- **Concentration en Cl⁻**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes 114 et 115.



Graphe 114



Graphe 115

Graphe 114. Concentration sanguine en Cl⁻, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 115. Concentration sanguine en Cl⁻, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

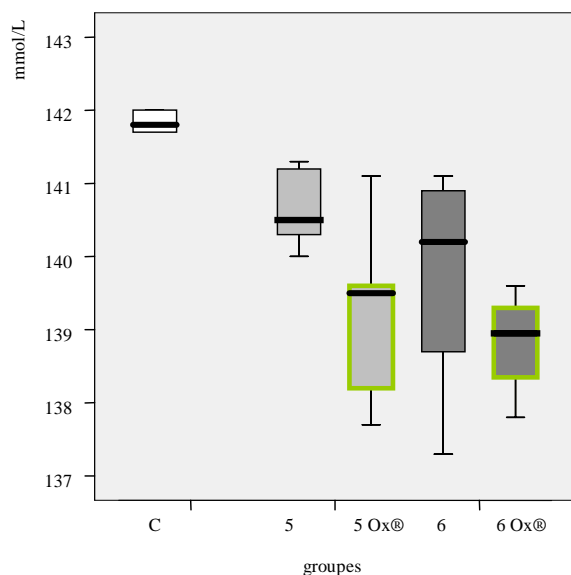
L'exposition à l'OTA induisait une baisse de la chlorémie chez les rats mâles et femelles (chapitre 3.3.1.2.2.1).

Aucune différence concernant la concentration sanguine en Cl⁻ n'est observée, ni, entre les groupes 5 et 5OX®, ni entre les groupes 6 et 6OX®, recevant un blé non traité ou traité par Oxygreen®. La diminution de l'exposition, suite à l'application du procédé Oxygreen®, n'atténue pas l'effet toxique de l'OTA sur ce paramètre ; cet effet est même amplifié pour les rats mâles du groupe 5OX® recevant le blé contaminé à 40µg/kg et traité par le procédé.

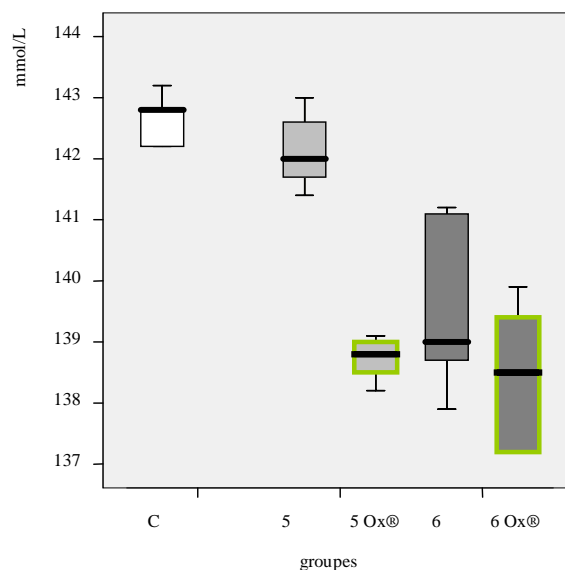
De même, à exposition équivalente, l'effet sur la concentration sanguine en chlore est plus prononcé chez les rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® (groupe 6OX®) que chez les rats recevant un blé non traité (groupe 5). Cette amplification n'est pas observée chez les rats femelles. Ceci signifie que cet effet toxique n'est pas seulement lié à la dose d'exposition, mais peut être dû à un métabolite de l'OTA. De plus, l'amplification de l'effet toxique n'est observée uniquement chez les rats mâles, ce qui peut être mis en parallèle avec les différences dépendantes du sexe concernant la métabolisation de l'OTA.

- **Concentration en Na⁺**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes 116 et 117.



Graphe 116



Graphe 117

Graph 116. Concentration sanguine en Na^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

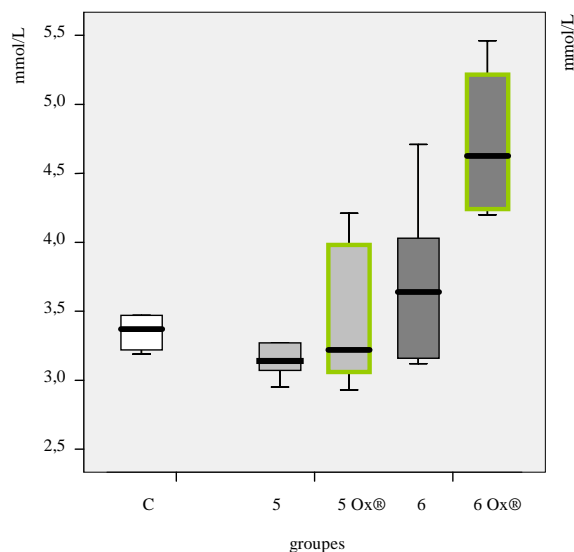
Graph 117. Concentration sanguine en Na^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

L'exposition des rats à l'OTA induit une diminution de la concentration sanguine en Na^+ de façon dose-dépendante, les femelles étant plus sensibles que les mâles (paragraphe 3.3.1.2.2.1). La diminution de la concentration sanguine en Na^+ , liée à l'exposition à l'OTA, est amplifiée pour les rats femelles et mâles du groupe 5Ox® recevant un blé traité par Oxygreen®, par rapport aux rats du groupe 5 recevant le blé non traité. De même, les rats femelles et mâles du groupe 6Ox®, exposés à une dose d'OTA comparable à celle du groupe 5, mais recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, ont une concentration sanguine en Na^+ nettement inférieure à celle des rats du groupe 5. Ceci signifie que l'impact de l'exposition à l'OTA sur la natrémie n'est pas seulement lié à la dose d'exposition, mais peut être dû à un métabolite de l'OTA.

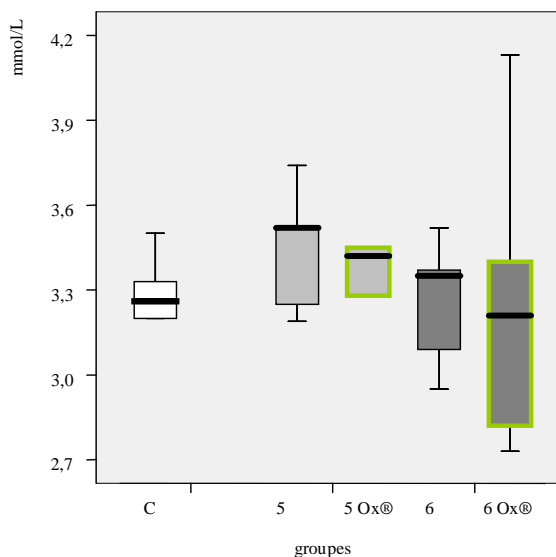
La diminution de l'exposition des rats par le procédé Oxygreen® ne permet pas de rétablir la concentration sanguine en Na^+ à un taux normal. En présence d'une sur-contamination en OTA, l'application du procédé Oxygreen® sur le blé entraîne une amplification de la diminution du taux sanguin en Na^+ .

- **Concentration en K^+**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 118



Graphe 119

Graphe 118. Concentration sanguine en K^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 119. Concentration sanguine en K^+ , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

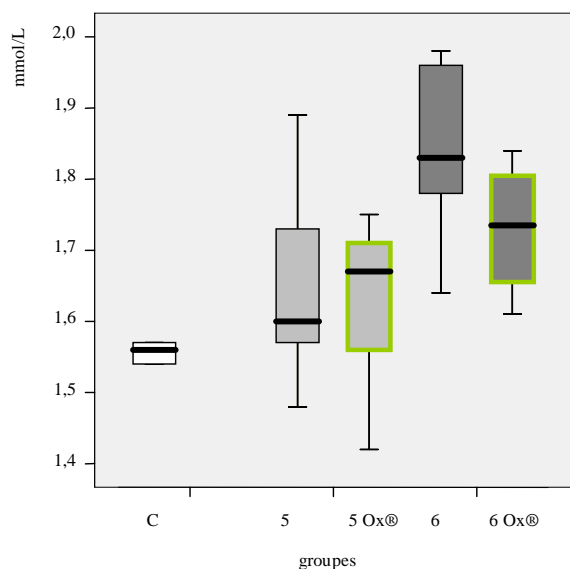
L'exposition des rats femelles à l'OTA ne modifie pas le taux sanguin en potassium alors que chez les rats mâles, l'exposition à l'OTA induit une l'augmentation de la concentration sanguine en K^+ selon un effet « en cloche », avec l'effet maximal pour le groupe 4 exposé à 500 nanog/kg pc/jour (paragraphe 3.3.1.2.2.1).

Pour les rats femelles recevant un blé contaminé en OTA, et traité par le procédé Oxygreen®, on observe une augmentation significative de la concentration sanguine en K^+ au sein du groupe 6Ox®, pour lequel, la concentration sanguine en K^+ est supérieure à celle du groupe de référence, mais également à celle du groupe 5 (exposé à la même dose d'OTA) ainsi qu'à celle du groupe 6. Cet effet n'est pas observé chez les rats mâles.

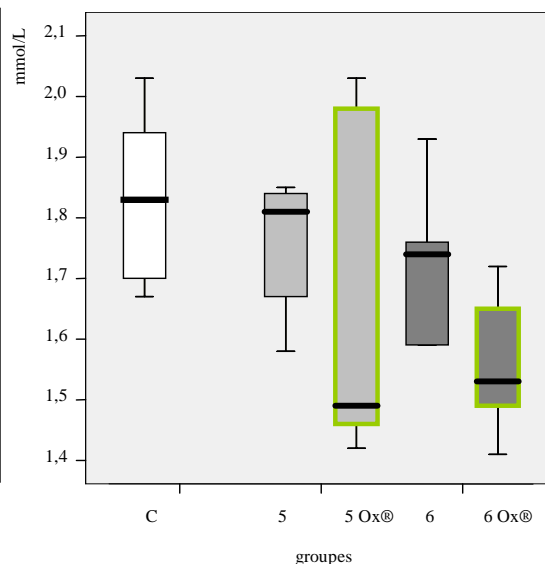
Une fois de plus, cet effet toxique n'est pas directement lié à la dose d'OTA ingérée et est dépendant du sexe, faisant suspecter l'implication d'un métabolite de l'OTA.

- **Concentration en Ca^{2+}**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 120



Graphe 121

Graphe 120. Concentration sanguine en Ca^{2+} , exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 121. Concentration sanguine en Ca^{2+} , exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

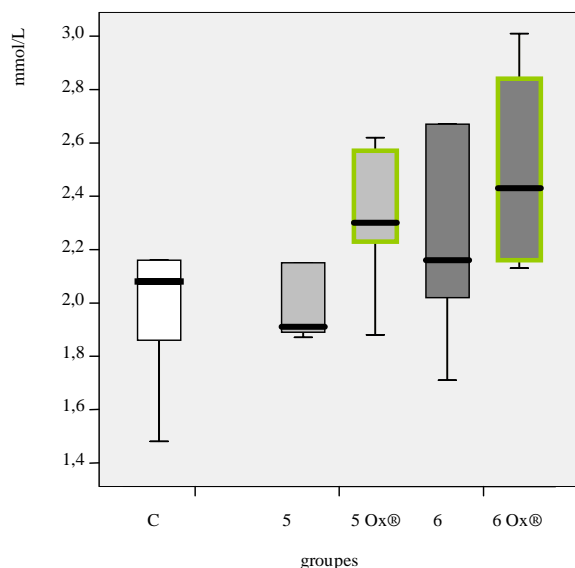
L'exposition des rats à l'OTA induit une augmentation de la concentration sanguine en Ca^{2+} chez les rats femelle alors qu'aucun effet significatif n'est observé chez les rats mâles (paragraphe 3.3.1.2.2.1).

La diminution de l'exposition des rats femelles à l'OTA par le procédé Oxygreen® ne permet que très peu de limiter l'effet de l'OTA sur la concentration sanguine en Ca^{2+} : l'augmentation de la concentration sanguine en Ca^{2+} , observée au sein du groupe 6 est légèrement atténuée au sein du groupe 6Ox®, recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®, cette valeur reste néanmoins significativement supérieure à celle du groupe de référence.

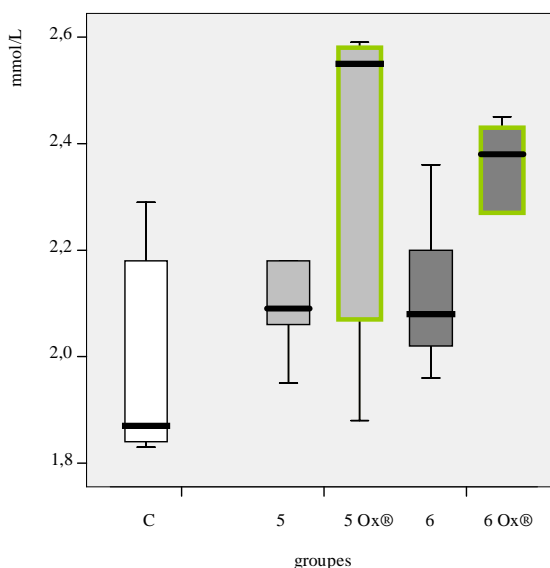
Chez les rats mâles, l'ingestion d'un blé traité par le procédé Oxygreen® ne module pas de manière significative ce paramètre, bien qu'une tendance à la baisse soit observée.

- **Concentration en phosphore inorganique**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles, recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 122



Graphe 123

Graphe 122. Concentration sanguine en phosphore inorganique, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 123. Concentration sanguine en phosphore inorganique, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

L'exposition des rats à l'OTA induit une augmentation de la concentration sanguine en phosphore inorganique selon un effet « en cloche » uniquement observé chez les rats mâles (paragraphe 3.3.1.2.2.1). La diminution de l'exposition des rats, par le procédé Oxygreen®, amplifie l'effet de l'OTA sur la concentration sanguine en phosphore inorganique, bien que les variations observées ne soient pas significatives. Cette amplification est nette dans le groupe 6Ox® de rats mâles, pour lesquels, la concentration sanguine en phosphore inorganique est significativement supérieure à celle du groupe de référence (groupe C), mais également à celle du groupe 5 exposé à la même dose d'OTA, et à celle du groupe 6.

Il est probable que l'amplification de cet effet toxique, chez les rats recevant le blé traité par le procédé Oxygreen®, soit lié à une modification de la métabolisation, cet effet n'étant pas directement lié à la quantité d'OTA ingérée.

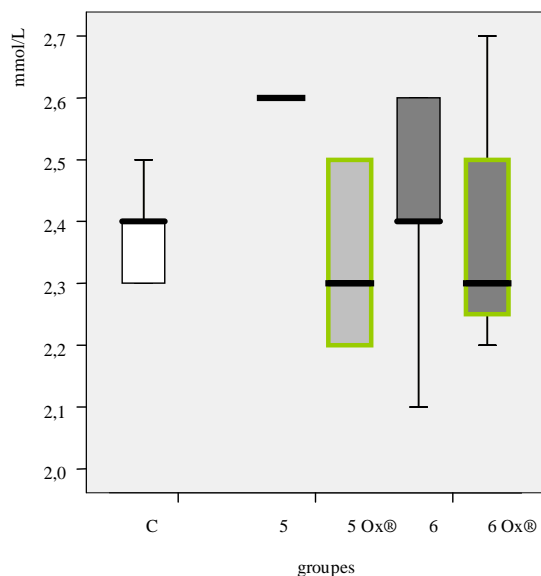
4.3.1.2.2.2 Concentration sanguine en glucose, cholestérol, urée, créatinine et triglycérides

• Concentration en glucose

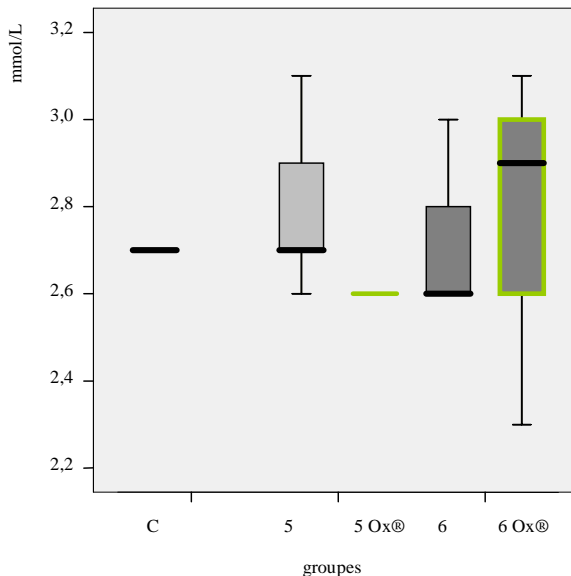
L'exposition des rats femelles et mâles à l'OTA n'induit pas de modification de la concentration sanguine en glucose. De même, l'ingestion de blé traité par le procédé Oxygreen® n'a pas d'incidence sur ce paramètre.

• Concentration en cholestérol

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 124



Graphe 125

Graphe 124. Concentration sanguine en cholestérol, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 125. Concentration sanguine en cholestérol, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

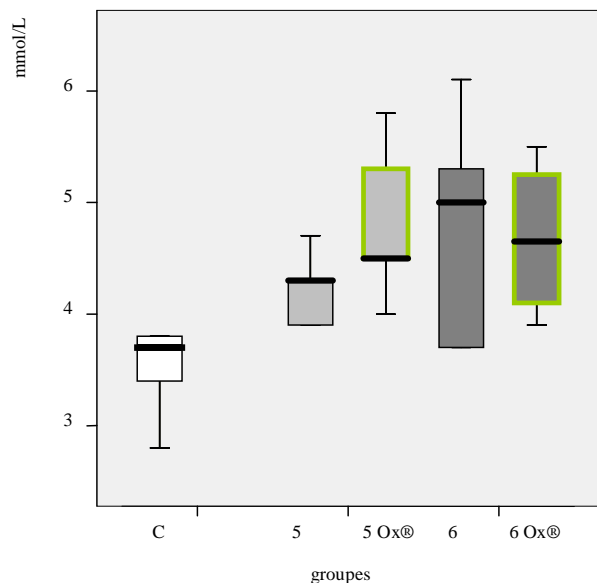
L'exposition des rats femelles à l'OTA induit une tendance à l'augmentation de la concentration sanguine en cholestérol selon un effet « en cloche » (paragraphe 3.3.1.2.2.2) alors qu'aucun effet significatif n'est noté chez les rats mâles.

La diminution de l'exposition des rats femelles du groupe 5, par le procédé Oxygreen®, ramène le taux de cholestérol dans le sang des rats du groupe 5Ox® à un niveau comparable à celui du groupe de référence.

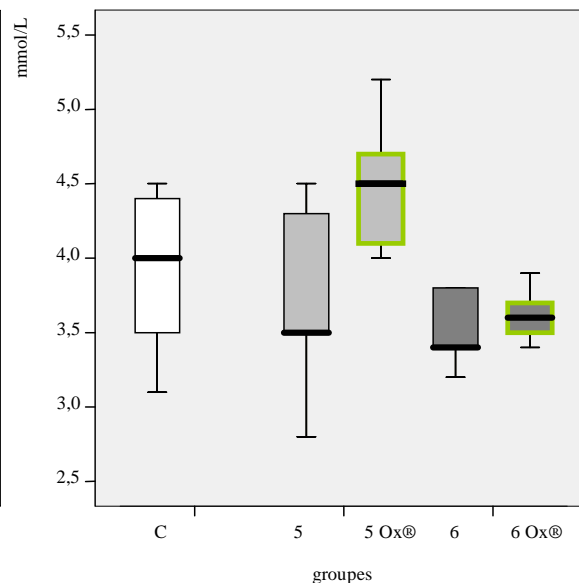
Chez les rats mâles, les valeurs 2,6 et 3,1mmol/l ont été exclues du groupe C par le logiciel statistique. De même, au sein du groupe 5Ox® deux valeurs (2,5 et 2,8mmol/l) ont été exclues. La prise en compte de ces valeurs montre que la concentration en cholestérol est soumise à d'importantes fluctuations, et que l'application du procédé Oxygreen® sur l'aliment n'a en soit pas d'incidence sur ce paramètre.

- **Concentration sanguine en urée**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous



Graphe 126



Graphe 127

Graphe 126. Concentration sanguine en urée, exprimée en mmol/l, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 127. Concentration sanguine en urée, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

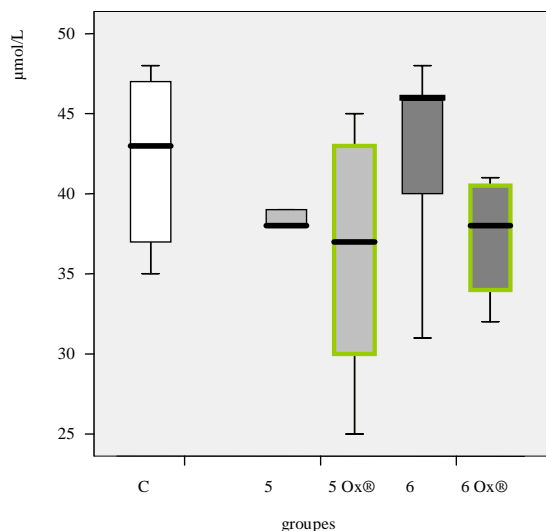
L'exposition des rats femelles à l'OTA induit une tendance à l'augmentation de la concentration sanguine en urée selon un effet dose dépendant (paragraphe 3.3.1.2.2.2) alors que pour les rats mâles, on ne note pas d'incidence de l'OTA sur ce paramètre.

Les rats femelles du groupe 5Oxo®, recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, ont une concentration sanguine en urée supérieure à celle du groupe de référence, ainsi qu'à celle du groupe 5. L'application du procédé Oxygreen® sur le blé amplifie l'effet de l'OTA sur la concentration sanguine en urée ; ceci s'explique par le fait que la baisse d'exposition à l'OTA n'est pas suffisante pour atteindre un taux pour lequel aucun effet n'est observé sur ce paramètre.

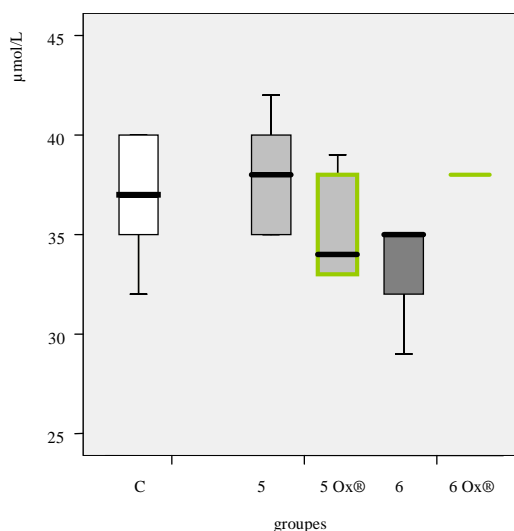
Pour les rats mâles, l'exposition à l'OTA n'induit pas de variations significatives concernant la concentration en urée. De même, l'application du traitement Oxygreen®, et la diminution de l'exposition des rats à l'OTA, n'induisent pas de variation significative de la concentration en urée.

- **Concentration en créatinine**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graph 128



Graph 129

Graph 128. Concentration sanguine en créatinine, exprimée en $\mu\text{mol/l}$, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

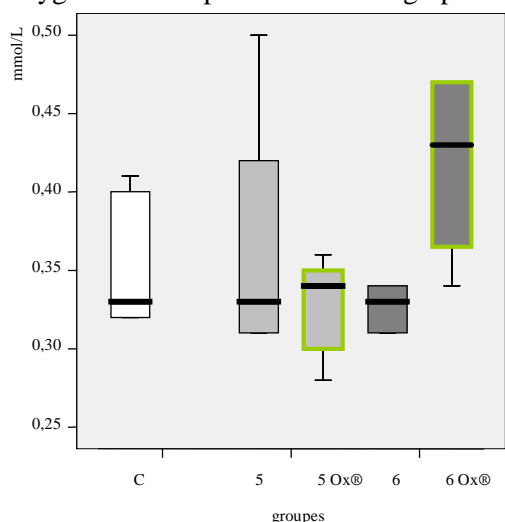
Graph 129. Concentration sanguine en créatinine, exprimée en $\mu\text{mol/l}$, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Pour les rats femelles, nous n'observons aucune différence significative entre les différents groupes de rats.

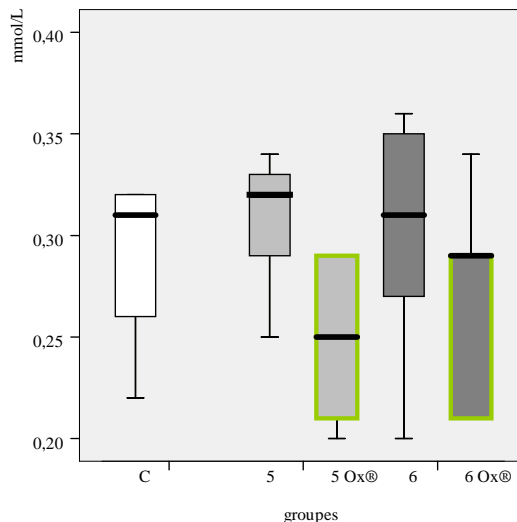
Pour les rats mâles, la diminution du taux de créatinine, observée au sein du groupe 6, n'est plus détectée au sein du groupe 6OX®, suite à la diminution de l'exposition de ces rats par application du traitement Oxygreen® sur le blé. Le taux de créatinine des rats du groupe 6OX® est comparable à celui des rats du groupe 5, exposés à la même dose d'OTA *via* un blé non ozoné.

• Concentration en triglycérides

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graph 130



Graph 131

Graph 130. Concentration sanguine en triglycérides, exprimée en mmol/l , chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 131. Concentration sanguine en triglycérides, exprimée en mmol/l, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

L'exposition des rats femelles à l'OTA ne modulait pas le taux de triglycérides (chapitre 3.3.1.2.2.2).

Les rats femelles du groupe 6Ox® ont une concentration sanguine en triglycérides sensiblement supérieure à celle des rats femelles du groupe 6, mais équivalente à celle des animaux du groupe 5 recevant une quantité équivalente d'OTA. Cette augmentation de la concentration en triglycérides n'est pas observée au sein du groupe 5Ox®. Par conséquent, le procédé Oxygreen® n'a aucun effet sur ce paramètre.

Pour les rats mâles des groupes 5Ox® et 6Ox®, nous observons une tendance à la diminution de la concentration sanguine en triglycérides ; néanmoins, ces variations ne sont pas significatives et la concentration en triglycérides dans les groupes recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® est comparable à celle du groupe de référence. Comme pour les rats femelles, le procédé Oxygreen® n'a aucun effet sur ce paramètre chez les rats mâles.

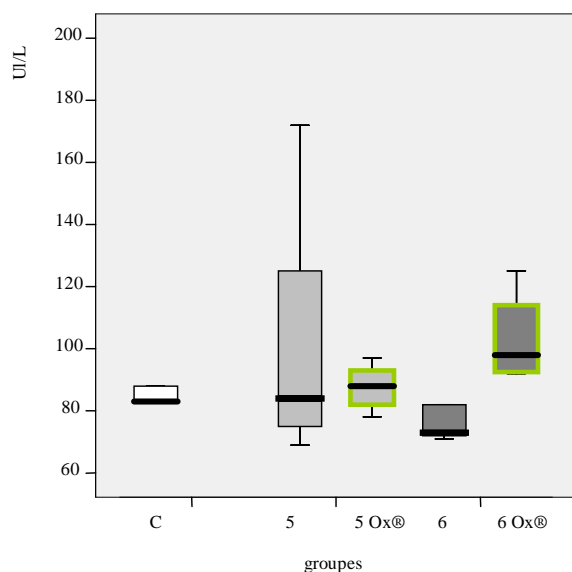
4.3.1.2.2.3 Concentration sanguine en ALP, ASAT, ALAT

- Concentration en ALP (phosphatase alcaline)**

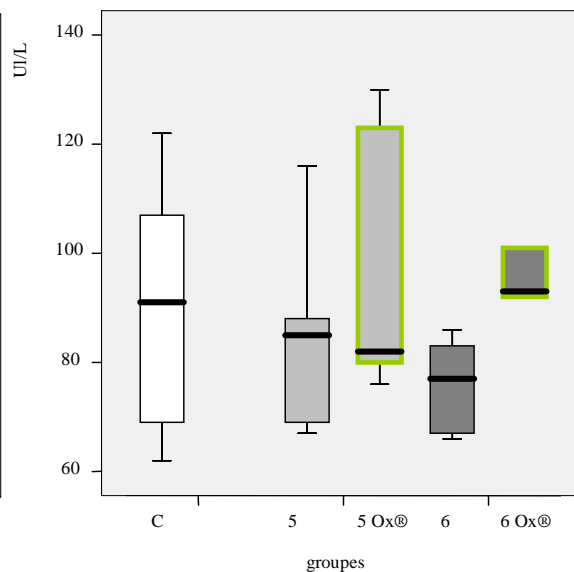
L'exposition des rats mâles à l'OTA n'induit pas de modification significative de la concentration en ALP pour les rats mâles et femelle. De même, ce paramètre n'est pas modifié pour les rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®.

- Concentration en ASAT (aspartate amino transférase)**

Les résultats obtenus avec les rats femelles et mâles sont présentés sur les graphes ci-dessous.



Graphe 132



Graphe 133

Graphe 132. Concentration sanguine en ASAT, exprimée en UI/L, chez les rats femelles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Graphe 133. Concentration sanguine en ASAT, exprimée en UI/L, chez les rats mâles recevant un blé traité (cadre extérieur vert) ou non (cadre extérieur noir) par le procédé Oxygreen®.

Chez les rats femelles, comme chez les rats mâles, la concentration en ASAT dans le sang des rats du groupe 6Ox® est supérieure à celle des rats du groupe 6. Néanmoins, à exposition égale, la concentration sanguine en ASAT dans le sang des rats mâles et femelles est équivalente, que ceux-ci reçoivent un blé traité ou non par le procédé Oxygreen® (groupe 6Ox® versus groupe 5). Par

conséquent, la variation de la concentration sanguine en ASAT dépend de la dose d'exposition à l'OTA et le procédé Oxygreen® n'a par lui-même pas d'incidence sur ce paramètre. L'exposition des animaux n'est pas suffisamment réduite pour que l'on observe une disparition des effets de l'OTA sur ce paramètre.

- **Concentration en ALAT (alanine amino transférase)**

L'exposition des rats femelles et mâles à l'OTA n'induit pas de modification de la concentration sanguine en ALAT. De même, l'ingestion de blé traité par le procédé Oxygreen® n'a pas d'incidence sur ce paramètre.

4.3.1.2.3 Conclusions

La diminution du niveau d'exposition des rats à l'OTA par le procédé Oxygreen® appliqué sur un blé modérément contaminé (groupe 5) permet de réduire les effets toxiques observés concernant :

- la baisse du poids relatif du rein des rats mâles et femelles
- la baisse du poids relatif du foie des rats femelles
- la baisse du taux de leucocytes sanguin pour les rats mâles
- l'augmentation de la concentration en fibrinogène dans le sang des rats femelles.

Il est clair que la baisse de l'exposition des animaux à l'OTA par le traitement du blé par le procédé Oxygreen® diminue les effets de l'OTA sur le système immunitaire, les phénomènes d'inflammation et l'atrophie des organes. Ceci indique que ces effets sont directement liés à la dose d'OTA ingérée.

Nous avons montré dans le chapitre 3 que l'exposition à l'OTA aux doses testées avait aussi un impact sur la fonction rénale : les taux de chlore, de sodium baissaient et le taux de phosphore inorganique augmentait. L'abaissement du taux d'OTA dans le blé par le procédé Oxygreen® ne réduit pas ces effets toxiques. On note même une amplification du phénomène. Ceci s'explique d'une part en considérant le fait que la toxicité de l'OTA suit une évolution en « cloche » en fonction de l'exposition : après application du procédé Oxygreen® sur le blé, le taux résiduel d'OTA est voisin de celui pour lequel l'effet maximal était observé ce qui se traduit par un effet plus marqué que celui observé dans le groupe recevant un aliment non traité. D'autre part, cette amplification de l'effet toxique peut être expliquée en considérant le fait que cet effet a pour origine la présence d'un métabolite de l'OTA, et non la molécule d'OTA en elle-même. Nous avons observé que la diminution de l'exposition des animaux à l'OTA par le procédé Oxygreen® induisait des modifications concernant la métabolisation de la toxine. La modification de la métabolisation peut expliquer ces variations concernant les effets toxiques consécutifs à une exposition à l'OTA.

La diminution de l'exposition des rats femelles améliore par contre l'effet délétère de l'OTA sur le taux de calcium.

4.3.2 Génotoxicité

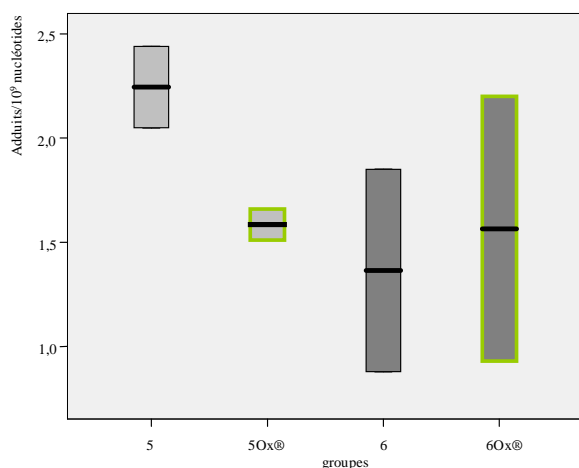
Nous avons cherché à déterminer le potentiel génotoxique de l'OTA résiduelle dans les organes des rats ayant reçu un blé traité par le procédé Oxygreen®.

L'ADN a été extrait sur les organes de plusieurs individus (rein et foie) et les adduits ont été post-marqués au P³².

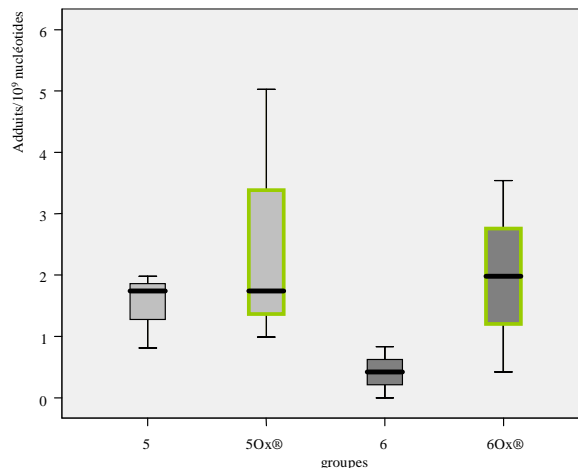
4.3.2.1 Potentiel génotoxique de l'OTA résiduelle au niveau rénal

Nous avons recherché la formation d'adduits à l'ADN rénal chez 3 rats mâles, et chez 2 rats femelles, recevant les lots de blés artificiellement contaminés ou non en OTA, et traités ou non par le procédé Oxygreen®. La séparation des adduits est réalisée par migration multidimensionnelle avec « contact-transfert ». Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

D'un point de vue qualitatif, on observe les mêmes adduits à l'ADN chez les rats mâles et femelles. On ne détecte pas de nouvel adduit à l'ADN dans les reins des rats ayant reçu un blé contaminé en OTA et traité par le procédé Oxygreen®.



Graphe 134



Graphe 135

Graphe 134. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le rein des rats femelles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).

Graphe 135. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le rein des rats mâles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).

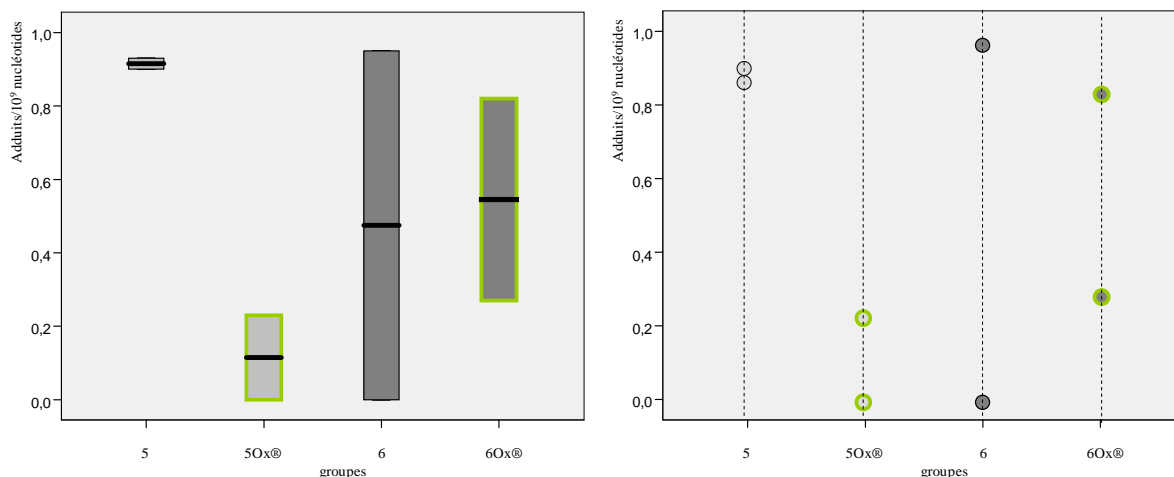
Chez les rats femelles, exposés à la plus forte dose d'OTA (groupe 6), la diminution de l'exposition des rats suite à l'application du traitement Oxygreen®, ne conduit pas une diminution du nombre total d'adduits à l'ADN rénal (groupe 6Ox®). Par contre, pour les rats exposés à une dose moyenne en OTA (groupe 5), le nombre total d'adduits à l'ADN rénal est significativement réduit suite à l'application du traitement Oxygreen® (groupe 5Ox®).

Pour les rats mâles, la diminution de l'exposition des rats du groupe 6, suite à l'application du procédé Oxygreen®, a pour effet une amplification de l'adduction au niveau rénal. Nous avons observé un effet « en cloche » de l'exposition à l'OTA, sur la formation d'adduits à l'ADN rénal des rats femelles et mâles. L'application du traitement Oxygreen® sur ce blé fortement contaminé en OTA, abaisse l'exposition des rats à l'OTA à un niveau pour lequel une quantité supérieure d'adduits à l'ADN est formée. Les rats mâles des groupes 5 et 6Ox®, exposés à une dose comparable d'OTA, ont une quantité équivalente d'adduits à l'ADN. Par conséquent, la formation de ces adduits est exclusivement liée à la dose d'exposition à l'OTA et le procédé Oxygreen® n'induit par lui-même aucune amplification du potentiel génotoxique de l'OTA.

4.3.2.2 Potentiel génotoxique au niveau hépatique

Les adduits à l'ADN ont été recherchés sur le foie de 2 rats mâles et de 2 rats femelles de chacun des groupes. Les adduits sont séparés par chromatographie multidimensionnelle avec « contact-transfert ». Nous n'observons pas de différence qualitative concernant la formation d'adduits à l'ADN ni en fonction du sexe des rats, ni en fonction de l'exposition ou de l'application du traitement Oxygreen® sur le blé.

Les résultats pour les rats femelles obtenus sont présentés sur le graphe 136.

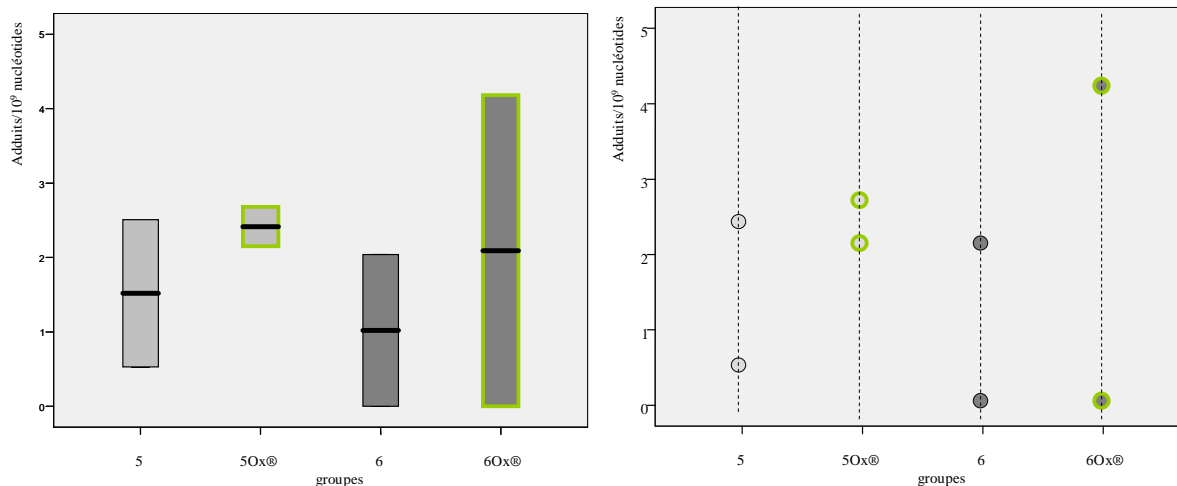


Graphe 136. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le foie des rats femelles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).

L'analyse des adduits à l'ADN, ayant été réalisée sur seulement deux individus, nous avons présenté sur le graphe de droite les valeurs individuelles obtenues.

Les rats femelles du groupe 5Ox®, recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® ont une quantité d'adduits à l'ADN inférieure à celle des rats femelles du groupe 5 : la diminution du niveau d'exposition des rats à l'OTA par le procédé Oxygreen® (groupe 5Ox®) permet de réduire la formation d'adduits à l'ADN. Par contre, en ce qui concerne la plus forte exposition (groupe 6), la diminution de l'exposition des rats femelles à l'OTA n'a pas d'effet sur la quantité d'adduits à l'ADN formés (groupe 6Ox®). Ceci est lié à la formation « en cloche » des adduits à l'ADN suite à l'exposition des rats à l'OTA.

Les résultats pour les rats mâles obtenus sont présentés sur le graphe 137.



Graphe 137. quantification des adduits à l'ADN, en nombre d'adduits/10⁹ nucléotides, dans le foie des rats mâles recevant un blé non traité par Oxygreen® (cadre extérieur noir) ou traité par Oxygreen® (cadre extérieur vert).

L'analyse des adduits à l'ADN, ayant été réalisée sur seulement deux individus, nous avons présenté sur le graphe de droite les valeurs individuelles obtenues.

Contrairement à ce qui est observé pour les rats femelles, la diminution de l'exposition des rats mâles à l'OTA, suite à l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, n'a pas d'incidence sur le nombre d'adduits à l'ADN hépatique : on détecte autant d'adduits à l'ADN dans les groupes de rats mâles recevant un blé traité ou non par le procédé Oxygreen®.

Au niveau hépatique, nous avons observé un effet « en cloche » pour la formation des adduits à l'ADN en fonction de l'exposition des rats à l'OTA. Le maximum d'adduits formé est observé au sein du groupe 4, exposé à 500ng/kg pc/jour. La diminution de l'exposition des rats à l'OTA, ne permet pas d'amener l'exposition des animaux à une valeur inférieure à la dose pour laquelle les effets les plus marqués sont observés. Ceci explique que nous n'observons pas une diminution de l'adduction pour les groupes recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®.

4.3.2.5 Conclusions

L'application du procédé Oxygreen® sur le blé, ne conduit pas à l'apparition de nouveaux adduits à l'ADN des organes des rats mâles et femelles, exposés à ce blé traité, mais modifie le profil d'adduction.

Au niveau pulmonaire, la diminution de l'exposition des rats par ozonation du blé, contribue à diminuer la quantité d'adduits formés à l'ADN des rats mâles et femelles. On note une modification du profil d'adduction à l'ADN pulmonaire pour les rats femelles. Ceci indique, que des variations du niveau d'exposition conduisent à la modulation de la métabolisation de l'OTA, pouvant être à l'origine de la formation d'adduits qualitativement et quantitativement différents.

Pour les rats mâles, la diminution de l'exposition, suite au traitement du blé par le procédé Oxygreen®, ne conduit pas à une diminution de l'adduction à l'ADN, tant au niveau rénal qu'au niveau hépatique. On note même une amplification de la formation des adduits à l'ADN rénal pour les rats mâles recevant un blé contaminé au plus fort taux d'OTA et traité par le procédé Oxygreen®. Ceci peut être mis en parallèle avec la métabolisation de l'OTA au niveau rénal et hépatique, modifiée chez les rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®.

Pour les rats femelles, aussi bien au niveau hépatique qu'au niveau rénal, nous observons une diminution de l'adduction à l'ADN suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé contaminé à 40µg/kg (groupe 5 *versus* groupe 5Ox®) ; l'application du procédé sur le blé contaminé à 100µg/kg en OTA n'a pas d'incidence sur le niveau d'adduction pour les rats femelles.

Nous constatons une différence importante entre mâles et femelles, comme ce qui a été observé au cours de l'étude de toxicité générale (paramètres biochimiques, physiologiques et hématologiques des rats). L'absence de réduction du niveau d'adduction au niveau hépatique et rénal, lorsque le traitement Oxygreen® est appliqué sur un blé contaminé à un fort taux d'OTA, est lié au fait, qu'une relation dose/effet linéaire entre exposition et adduction n'est établie que lors de l'exposition des rats à des doses d'OTA inférieures à 3500ng/kg pc/jour (groupes 1, 3 et 4).

Conclusion, discussion générale, et perspectives

Le rôle des moisissures, et des mycotoxines, est suspecté dans certaines pathologies humaines et animales depuis plusieurs décennies (Miller & Trenholm, 1994 ; pour un article général, voir CAST, 2003 et Pfohl-Leskowicz, 1999c). Certaines mycotoxines, notamment l'ochratoxine A (OTA), semblent être liées à l'apparition de cancers, et font l'objet de réglementations au niveau Européen.

L'OTA est associée à la néphropathie endémique des Balkans, mais également à divers effets toxiques tels que l'immunotoxicité, l'hépatotoxicité, la tératogénicité ou la carcinogénicité (cf introduction bibliographique ; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 2002a). La contamination en OTA étant ubiquitaire, ceci pose un réel problème de santé publique. La présence de cette toxine dans divers aliments est réglementée en Europe depuis 4 ans dans les céréales et depuis l'année dernière dans les produits de la vigne, le café, et les aliments pour bébé (règlements CE 472/2002, CE N°683/2004 et N°123/2005). Cette toxine étant particulièrement résistante aux procédés de transformation agro-alimentaires (cf introduction bibliographiques, chapitre 2), il est important de trouver des moyens de limiter sa présence dans l'aliment.

Le but de cette thèse est de déterminer si le procédé Oxygreen® peut être une solution à la problématique de la contamination par l'OTA des céréales.

Pour cela, nous avons tout d'abord testé l'efficacité de l'ozonation de l'OTA en solution afin de vérifier sa dégradation et la non apparition de produits toxiques ou génotoxiques. La dégradation est totale après 5 minutes de traitement à l'ozone. Sur modèle de cellules rénales, cible de l'OTA, aucune toxicité ni génotoxicité n'est observée. Dans une matrice complexe, comme le blé, l'ozonation a eu pour cible non seulement l'OTA, mais également des produits intrinsèques au blé. Bien que la durée du traitement par l'ozone ait été augmentée pour la décontamination en OTA du blé, nous n'atteignons pas un taux d'élimination comparable à celui observé en solution aqueuse. Une part d'OTA résiduelle est retrouvée dans l'aliment traité par le procédé (comprise entre 30 et 50% de la contamination initiale). Ceci résulte de deux phénomènes :

- (i) l'accessibilité de l'OTA à l'ozone est moindre quand celle-ci est associée au blé
- (ii) l'ozone, appliqué sur le blé, réagit avec l'OTA, mais également avec les autres composés de la matrice, ce qui limite son efficacité pour la décontamination. D'autres auteurs ont montré que la présence de matière organique réduisait le potentiel de l'ozone pour la décontamination en mycotoxines ou en micro-organismes, (Mac Kenzie *et al*, 1997 ; Güzel-Seydim *et al*, 2004).

Nous avons observé *in vitro* que la qualité du blé, sur lequel le procédé Oxygreen® est appliqué, est un paramètre important. Notamment, le stade de germination du blé a une incidence sur l'innocuité du procédé. Le blé pré-germé induit, sur des cellules exposées à un extrait de blé concentré, la formation d'adduits à l'ADN. Ce potentiel génotoxique est amplifié suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé.

Malheureusement le blé de référence utilisé dans notre étude était un blé caractérisé par un temps de chute de Hagberg bas (inférieur à 200). Ce blé, pré-germé, est un blé inutilisable d'un point de vue technologique. L'ozonation de ce blé a favorisé la germination du blé ce qui nous a conduit à observer une amplification de son potentiel génotoxique sur modèle cellulaire. L'analyse des profils d'adduits nous a clairement montré que ceci n'était aucunement lié à l'OTA, mais à ce phénomène de germination. Les composés impliqués pourraient être les acides hydroxamiques, connus pour induire la formation d'adduits à l'ADN (Hashimoto *et al*, 1991 ; Ishizaki *et al*, 1982), des micronoyaux et des mutations dans le test d'Ames (Buchman *et al*, 2006). Ces substances sont des pesticides naturels, stockés dans les vacuoles des plantes sous forme de D-glycosides inactifs. L'ozonation du blé favorise la destruction de ces vacuoles, et surtout induit certaines enzymes de dégradation, permettant l'élimination de l'aglycone. Il serait nécessaire de vérifier *in vivo*, que l'ingestion de ces lots de blé pré-germés ne conduit pas à l'apparition d'effets génotoxiques.

Les essais de panification, menés avec ces lots de blé pré-germés, ont montré que l'application du procédé Oxygreen® permettait d'en améliorer les propriétés technologiques. Néanmoins, au vu des résultats de l'étude de toxicité et de génotoxicité obtenus *in vitro*, l'usage de ce procédé, dans le but d'améliorer les propriétés technologiques de lots de blé initialement non panifiables, n'est plus envisagée par l'entreprise développant le procédé. L'application du procédé Oxygreen® sur un blé de qualité meunier ne présente, en revanche, aucun problème au vu des résultats des études *in vitro*.

Dans la suite du travail, nous avons étudié *in vivo*, chez des rats Dark Agouty, si la diminution de l'exposition des rats à l'OTA, par l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, permet de réduire certains des effets toxiques observés conséquemment à l'exposition à cette toxine. Notre choix s'est porté sur les rats Dark Agouty car des différences en fonction du sexe ont été observées concernant les effets carcinogènes de l'OTA (Castegnaro *et al*, 1998 ; Pfohl-Leskowicz *et al*, 2002b), cette différence étant notamment liée à l'expression de CYP2C de nature différente entre mâles et femelles (Pfohl-Leskowicz *et al*, 1998). D'autre part, nous avons beaucoup de données, concernant notamment les inductions enzymatiques, recueillies lors de l'étude faite chez ces rats par Anne Molinié durant sa thèse (Molinié, 2004). L'étude des effets liés à une exposition subchronique à l'OTA sur ce modèle animal permet de rendre compte des variabilités inter-individuelles et dépendantes du sexe existant concernant le potentiel toxique de l'OTA.

Nous avons suivi les effets toxiques qui pouvaient être engendrés chez des rats mâles et femelles par l'ingestion de faibles doses d'OTA (entre 40ng /kg pc/jour et 8500ng/kg pc/jour). Nous avons suivi la toxicocinétique de l'OTA, administrée par voie orale *via* un aliment contaminé, ainsi que les effets toxiques consécutifs à cette exposition. Cette voie d'exposition est comparable à la voie d'exposition de l'homme à l'OTA, puisque la majeure part de l'exposition humaine a pour origine les céréales. La nature de la matrice a son importance dans l'étude de la toxicocinétique et des effets toxiques de l'OTA. En effet, il a été montré que la nature de la matrice pouvait avoir une incidence sur le transport d'un contaminant à travers l'épithélium intestinal (Wienk *et al*, 1999 ; Brandon *et al*, 2006) ; la bioaccessibilité de l'OTA, déterminée par sa libération depuis la matrice dans le tractus gastrointestinal, est un paramètre important qui influencera son absorption. Il a été montré, *in vitro*, que la présence simultanée de certains polyphénols (chrysine, quercétine, génistéine) contribuait à augmenter l'absorption de l'OTA, vraisemblablement par un mécanisme de compétition avec les pompes MRP2 (« Multi-drug Resistance Protein ») permettant la sortie de l'OTA vers la lumière intestinale (Berger *et al*, 2003 ; Sergent *et al*, 2005 ; Larondelle, 2005). Dans une étude récente, il a été montré que l'exposition des animaux à l'OTA par gavage n'était pas équivalente à l'exposition *via* l'aliment (Miljkovic *et al*, 2002), notamment concernant les concentrations sanguines en OTA ou la persistance des adduits à l'ADN formés. Ceci montre l'importance de la nature de la matrice, mais également de la voie d'administration de l'OTA, pour l'étude de l'absorption et de la toxicocinétique de cette toxine.

L'OTA présente dans l'aliment, est absorbée par diffusion passive de la forme non ionisée ou de la forme mono anion, au niveau stomacal et intestinal, pour rejoindre le compartiment sanguin (Galtier, 1978 ; Roth *et al*, 1988 ; pour une revue, voir Ringot *et al*, 2006). Nous avons observé dans notre étude que, pour les doses moyennes d'exposition de 40, 170 et 500 ng/kg pc/jour (respectivement groupes 1, 3 et 4), la quantité d'OTA retrouvée, au bout de quatre semaines, dans le sérum, dans les organes, ainsi que celle excrétée dans les urines des rats, sont du même ordre de grandeur. En ce qui concerne les deux plus fortes doses d'exposition testées ici, 3500 et 8500ng/kg pc/jour, la concentration sérique, ainsi que la quantité d'OTA retrouvée dans les organes et celle excrétée dans les urines, augmentent en relation avec la dose d'exposition. Les quantités d'OTA, relativement élevées au vu de l'exposition, retrouvées chez les rats des groupes 1 et 3, peuvent résulter d'une demi-vie d'élimination de la toxine comparativement plus longue quand la dose d'exposition à l'OTA est modérée, ou peuvent être liées aux phénomènes de réabsorption biliaire et/ou rénale, plus efficaces lors de faibles doses d'exposition. D'autre part, l'intestin joue un rôle de barrière dans l'entrée des xénobiotiques dans l'organisme (Wacher *et al*, 2001 ; Zhang & Bennet, 2001). L'absorption intestinale, par diffusion passive ou par des transporteurs, conditionne la concentration sanguine en xénobiotique (Ganapathy & Leibach, 1982 ; Amidon & Lee, 1996 ; Tsuji & Tamai, 1996 ;

Terada & Inui, 2004). Il a été montré que l'OTA altérerait les fonctions de barrière de l'épithélium intestinal, par une diminution de la résistance transépithéliale. Cette diminution de la résistance transépithéliale peut faciliter l'absorption des xénobiotiques par la voie paracellulaire (Daugherty & Mrsny, 1999). L'OTA peut faciliter sa propre absorption en déstabilisant les jonctions étroites entre les cellules épithéliales de l'intestin (Maresca *et al.*, 2001). Ce mécanisme peut en partie expliquer le fait que des concentrations élevées en OTA sont retrouvées dans le sang des rats exposés aux deux plus fortes doses, alors que des concentrations relativement stables sont retrouvées dans le sang des rats exposés aux trois plus faibles doses. Pour les fortes doses d'exposition, l'absorption de l'OTA est facilitée et augmentée, alors que pour les faibles doses d'exposition, celle-ci est limitée et ne dépend pas de la quantité d'OTA contenue dans l'aliment.

Dans les conditions d'ozonation utilisées dans l'étude, la diminution du niveau de contamination en OTA du blé, par le procédé Oxygreen®, a pour conséquence une diminution équivalente de l'exposition des rats. Ceci se traduit par une réduction quasi-équivalente de la quantité d'OTA circulant dans le compartiment sanguin, ainsi que de celle stockée dans les organes des rats. Néanmoins, la quantité d'OTA dans le sang des rats femelles, ainsi que dans les organes des rats mâles, quoique réduite, l'est de façon moins prononcée que la diminution de l'exposition des rats. Cette observation peut être expliquée par plusieurs hypothèses.

(i) Ceci peut être dû à l'absorption au niveau intestinal d'une part plus importante de l'OTA par les animaux recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®. L'application du procédé Oxygreen® peut modifier la matrice, augmentant la biodisponibilité de l'OTA résiduelle. L'ozone, dans le cadre du procédé Oxygreen®, a la capacité de couper les liaisons intra-moléculaires dans les macromolécules, permettant entre autre la libération de substances comme les polyphénols. En effet, une partie des fibres insolubles, associées à des polyphénols, sont converties en fibres solubles, sous l'action de l'ozone. Il a été montré que certains polyphénols (chrysine, quercétine, génistéine) augmentent l'absorption de l'OTA dans l'organisme, vraisemblablement par un mécanisme de compétition avec les pompes permettant le rejet de l'OTA vers la lumière intestinale (Berger *et al.*, 2003 ; Sergent *et al.*, 2005 ; Larondelle, 2005). Ce mécanisme de l'ozone sur la libération des polyphénols pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'absorption de l'OTA.

(ii) Ceci peut être dû à l'ingestion d'OTA « cachée », c'est-à-dire, à un dérivé de l'OTA capable de se reconvertir en OTA *in vivo*. Des essais de décontamination de l'OTA par des agents alcalins ont conduit à l'ouverture du cycle lactone de l'OTA (OP-OTA). Les conditions d'acidité trouvées au niveau stomacal permettent la fermeture et la reformation de l'OTA *in vivo* (Chelkowski *et al.*, 1981a ; Castegnaro *et al.*, 1991). Dans notre étude, nous n'avons pas observé la formation de la forme ouverte, ni après ozonation de solutions pures d'OTA, ni après ozonation du blé contaminé en OTA. Cependant, l'analyse à l'HPLC des mycotoxines à partir du blé, nécessite une extraction de ces mycotoxines à partir de la matrice qui est réalisée à pH acide. Ces conditions de pH (pH 2), contribuent à la fermeture du cycle lactone de l'OP-OTA. Les solutions d'OTA ozonées, celles-ci ont été analysées directement à l'HPLC. L'OP-OA n'a pas été identifiée. Cependant, après ozonation, nous avons observé une acidification de la solution de mycotoxines, jusqu'à un pH de 4, ce qui peut contribuer à la fermeture de l'OP-OA éventuellement formée. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure la formation d'un tel dérivé, suite au traitement par l'ozone du blé.

(iii) Ceci peut être dû à une modification des paramètres de stockage de l'OTA résiduelle chez les rats. Nous avons observé que les rats femelles, recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, ont une quantité supérieure, et hétérogène, d'OTA dans le sang. Ces rats femelles stockaient une quantité d'OTA dans le rein, comparativement plus réduite que ne l'est leur exposition. Par conséquent, l'OTA sérique plus élevée détectée chez ces rats femelles peut en partie résulter de ces modifications des paramètres de stockage, et du déstockage de l'OTA. Cette explication n'est que partielle puisque les rats mâles stockent comparativement plus d'OTA, sans que leur concentration sérique en OTA ne soit réduite.

(iv) Ceci peut être dû à une modification des paramètres d'élimination de l'OTA résiduelle chez ces rats. Cependant, nous avons observé que la quantité d'OTA excrétée par la voie urinaire n'est pas réduite suite à l'application du procédé Oxygreen® sur le blé.

(v) Ceci peut être dû à des modifications concernant le potentiel de métabolisation des animaux. Nous avons observé que l'ingestion d'un blé traité par le procédé Oxygreen® conduit à

l'augmentation de la formation de certains métabolites. Cette modification du profil de métabolisation de l'OTA résiduelle peut conduire à favoriser son accumulation dans les organes. Ceci peut expliquer que le stockage de l'OTA dans les organes des rats mâles recevant un blé traité par le procédé Oxygreen® est réduit d'un facteur inférieur à celui de l'exposition.

Ces hypothèses, permettant d'expliquer la présence d'OTA en quantité légèrement supérieures par rapport à celles attendues au vu de l'exposition, chez les rats recevant un blé traité par le procédé Oxygreen®, ne s'excluent pas l'une l'autre, et différents mécanismes peuvent intervenir simultanément pour aboutir à cette observation.

L'OTA présente dans le compartiment sanguin, non fixée aux protéines, est acheminée vers les différents organes. Dans notre étude, le schéma de distribution de l'OTA, au bout de quatre semaines d'exposition, est le suivant : des quantités équivalentes sont retrouvées dans le foie et les poumons, supérieures à celles des reins (équivalentes à celles des testicules) elle-même supérieures à celles du cerveau, aussi bien chez les rats femelles que chez les rats mâles, et ce quelle que soit la dose d'exposition à l'OTA. Cette distribution a été observée par Kane *et al*, chez des rats recevant exposés à 144µg d'OTA/kg pc/jour, pendant 12 jours, par intubation (Kane *et al*, 1986b), ainsi que chez des poulets, exposés par voie orale, pendant 4 semaines à de l'OTA (Biró *et al*, 2002). De même, chez les rats et les souris, par voie intraveineuse, la distribution de l'OTA dans les organes suit l'ordre décroissant suivant : les poumons, puis le foie, le cœur et les reins (Fuchs *et al*, 1988a ; Breitholz-Emmanuelson *et al*, 1992).

La réduction de l'exposition des rats, à la suite de l'application du procédé Oxygreen® sur l'aliment, ne conduit pas à une modification de la distribution de l'OTA résiduelle dans les différents organes, mais diminue de façon globalement équivalente la concentration tissulaire en OTA.

Nous avons observé des cinétiques différentes concernant le stockage de l'OTA en fonction de l'organe. La distribution de l'OTA ingérée dépend de son transport dans l'organe et de son élimination. Dans le foie, l'élimination de l'OTA va dépendre de son transport vers le foie, de sa métabolisation, de son excrétion biliaire ainsi que son passage vers le sang (Pang & Rowland, 1977 ; Pang & Gillette, 1978 ; Yamasaki *et al*, 1996 ; Shitara *et al*, 2005). Au niveau rénal, la clairance de l'OTA dépend de la filtration glomérulaire, de la sécrétion tubulaire et de la réabsorption (Inui *et al*, 2000 a, b ; Dresser *et al*, 2000 ; Dahlmann *et al*, 1998). Rappelons que les transporteurs diffèrent au niveau rénal et hépatique (Kusuhara & Sugiyama, 2002). L'OTA pénètre dans les cellules essentiellement par des transporteurs actifs. Au niveau hépatique, l'entrée de l'OTA se fait *via* les transporteurs Oatp de façon saturable ($K_m=18,9\mu M$) (Kontaxi *et al*, 1996). Au niveau de la paroi luminale des cellules tubulaires, le transport actif de l'OTA s'effectue par trois types de transporteurs : les transporteurs de la phénylalanine, de H⁺/dipeptides et les transporteurs des anions organiques (Sokol *et al*, 1988 ; Babu *et al*, 2002). Au niveau basolatéral, seuls les transporteurs des anions organiques véhiculent l'OTA dans les cellules rénales et son transport est spécifiquement inhibé par des inhibiteurs des Oat (Stein *et al*, 1985 ; Jung *et al*, 2001). Au niveau du tubule proximal, l'implication des Oat 1 et 3 a été mise en évidence pour le transport entrant de l'OTA. Ce transport est dépendant de la dose et est saturable ($K_m = 0,42 \mu M$ pour hOat1 et $K_m = 0,75\mu M$ pour hOat3) (Jung *et al*, 2001). Au niveau rénal, la sécrétion trans-épithéliale de l'OTA est saturée plus rapidement que l'entrée d'OTA : le pourcentage d'OTA, entré dans le rein, qui sera sécrété, diminue quand la concentration en OTA augmente, ce qui explique son accumulation dans le rein (Bahneman *et al*, 1997). De plus, l'exposition chronique à l'OTA induit une diminution de la capacité du tubule proximal à excréter les anions organiques (Gekle & Sibernagl, 1996). L'OTA emprunte elle-même les transporteurs d'anions organiques pour son excrétion (Jung *et al*, 2001 ; Babu *et al*, 2002), et peut par ce mécanisme réduire sa propre élimination par la voie urinaire.

Nous avons constaté que des quantités équivalentes d'OTA sont excrétées dans les urines des rats exposés respectivement à environ 40, 170 et 500ng/kg pc/jour. La quantité d'OTA excrétée par les rats mâles exposés aux doses de 3500 et 8500ng/kg pc/jour, n'est pas significativement différente de celle excrétée par les rats mâles exposés aux doses les plus faibles de notre étude. Chez les rats femelles, une quantité d'OTA supérieure est excrétée dans les urines des rats exposés aux deux plus

fortes doses d'OTA, confirmant l'existence de mécanismes différents en fonction du sexe. Les protéines rénales, dont notamment un transporteur d'anion organique, ont une affinité trois fois supérieure pour l'OTA chez les rats mâles, par rapport aux protéines des rats femelles (Heussner *et al*, 2002). Ces différences observées entre mâles et femelles concernant le stockage peuvent expliquer la différence de toxicité de l'OTA.

Il est intéressant de noter que la diminution de l'exposition des rats à l'OTA par le procédé Oxygreen® ne conduit pas à une réduction de la quantité d'OTA excrétée dans les urines, montrant que les mécanismes d'excrétion de l'OTA par voie urinaire sont saturés aux doses d'exposition testées dans notre étude. Par contre, l'excrétion urinaire des métabolites est favorisée, notamment chez les rats mâles, suggérant que l'excrétion des métabolites s'effectue par des mécanismes de transport différents de ceux utilisés par l'OTA.

Dans notre étude, l'exposition des rats à l'OTA conduit à l'observation, chez les rats mâles et femelles, d'effets sur les marqueurs de l'immunotoxicité, ainsi qu'à une régression du thymus chez les rats femelles. Ceci confirme les résultats obtenus par Dortant *et al* (2001) sur le potentiel immunotoxique de l'OTA. Dans leur étude, les effets sur les organes lymphoïdes et sur la moelle osseuse sont significatifs lors du traitement de rats femelles pendant 4 semaines à des doses de 1,68mg/kg pc/jour. L'effet est plus important quand les rats sont âgés. Les conditions d'exposition utilisées dans notre étude sont inférieures à celles testées par Dortant *et al* (2001) ; néanmoins, nous observons un effet sur les marqueurs de l'immunotoxicité, bien que celui-ci soit moins prononcé. L'exposition à l'OTA induit notamment une déplétion de la population de leucocytes, effet également mis en évidence par Müller *et al*, chez la souris et chez le porc (Müller *et al*, 1995, 1999). Bien que les doses d'exposition testées dans notre étude soient nettement inférieures à celles utilisées par ces autres auteurs, nous avons pu observer l'incidence de l'OTA sur ces paramètres. La diminution de l'exposition des rats à l'OTA, par le procédé Oxygreen®, permet de rétablir le taux de leucocytes sanguins chez les rats mâles, alors que les effets observés chez les rats femelles ne sont pas contrecarrés. Ceci confirme une fois de plus la différence de susceptibilité à l'OTA entre les mâles et les femelles.

Bien que le foie, le système immunitaire et le cerveau (Alvarez *et al*, 2004 ; Monnet-Tschudi *et al*, 1997) soient des cibles potentielles de l'action de l'OTA, le rein reste la cible privilégiée de l'action toxique de l'OTA ce qui se manifeste par une atrophie rénale avec hypertrophie des tubules proximaux et des glomérules, accompagné d'une fibrose. Au cours de notre étude, nous avons observé une réduction du poids relatif du foie et des reins des rats mâles et/ou femelles, confirmant partiellement les résultats d'Alvarez *et al* (2004). La réduction du niveau d'exposition à l'OTA permet d'atténuer l'effet observé au niveau rénal mais pas au niveau hépatique.

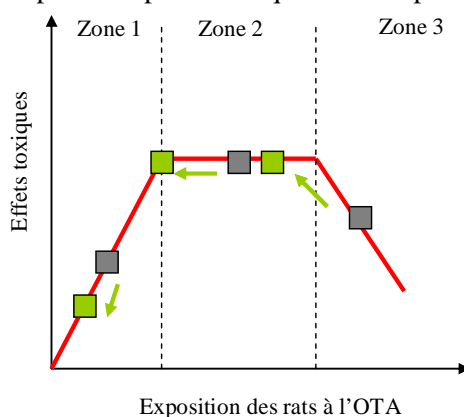
Des perturbations de la concentration sanguine en divers électrolytes ont été observées suite à l'exposition des rats mâles et femelles à l'OTA. Le rein est l'organe principal du maintien de l'homéostasie, avec excrétion et réabsorption de l'eau et des électrolytes tout au long du néphron. Plusieurs études montrent que l'OTA diminue la formation d'urine primaire, réduit l'élimination des déchets, et perturbe la répartition des électrolytes au niveau sanguin et urinaire (pour une revue voir Gekle & Sibernagl, 1996 ; Gekle *et al*, 2005). Dans notre étude nous avons noté des modifications de la concentration sanguine en électrolytes (Cl^- , Na^+ , K^+), de façon dépendante de la dose d'exposition, chez les rats mâles et femelles. Ceci confirme les études précédentes montrant que l'exposition à l'OTA exerce un effet sur l'excrétion en NaCl , en K^+ et en H^+ (Krogh *et al*, 1974 ; Gekle *et al*, 1993b, 1998).

Des variations de l'homéostasie calcique, ainsi que du pH urinaire, suite à l'exposition à l'OTA, ont été mises en évidence par plusieurs études (Delacruz & Bach, 1990 ; Gekle *et al*, 1994, 1995, 2005 ; Schramek *et al*, 1997 ; Eder *et al*, 2000). Nous avons montré que le taux sanguin en calcium est modifié pour les rats femelles exposés à l'OTA ; par contre, le pH urinaire ne varie pas. Cette absence de modification du pH urinaire, généralement liée à la réabsorption de HCO_3^- au niveau du tubule suite à une exposition à l'OTA (Kuramochi *et al*, 1997), peut s'expliquer considérant les doses d'exposition

relativement faibles utilisées dans notre étude. Par contre, les variations de l'homéostasie calcique ont été observées dans différentes études pour des doses d'exposition de l'ordre du nanomolaire en OTA, ou lors d'exposition répétées à de faibles doses. En effet, l'activité de la pompe à Ca^{2+} , ATP-dépendante, est augmentée par une exposition à une forte dose unique d'OTA, ainsi que par une exposition répétée à de faibles doses d'OTA (Chong & Rahimtula, 1992). De plus, Benesic *et al*, (2000) et Gekle *et al*, (2005) montrent que l'exposition des cellules proximales de tubule rénal, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, a une incidence sur l'homéostasie calcique, et par conséquent sur tous les mécanismes cellulaires contrôlés par le Ca^{2+} .

Les marqueurs signalant une atteinte de la fonction rénale diffèrent entre mâles et femelles. Des variations de la concentration en chlore et en sodium sont observées chez les rats des deux sexes, alors que la variation de l'homéostasie calcique et de la concentration en urée ne sont observées que chez les femelles. A l'inverse, on note des variations de la concentration en potassium et en phosphore inorganique uniquement chez les rats mâles.

Ces variations électrolytiques, observées chez les rats mâles et femelles, signalant une insuffisance rénale, ne sont pas, ou peu, rétablies suite à la diminution de l'exposition des rats par le traitement Oxygreen®. Ceci est lié au fait que l'exposition des rats n'est pas suffisamment réduite pour que l'on se place dans les conditions dans lesquelles une relation dose-effet linéaire peut être observée. Nous avons schématisé ci-après la réponse toxique à une exposition croissante.

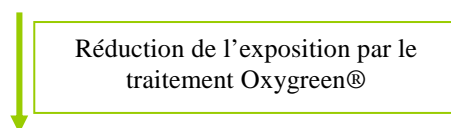


Effet d'une exposition à l'OTA

Zone 1 : effet toxique dépendant de la dose

Zone 2 : effet toxique atteint un plateau

Zone 3 : effet toxique réduit



Effet du procédé Oxygreen® sur la toxicité de l'OTA

Contamination initiale en zone 1 : effet toxique réduit

Contamination initiale en zone 2 : effet toxique non modifié

Contamination initiale en zone 3 : effet toxique amplifié

Figure 24. modélisation des effets toxiques de l'OTA en fonction de la dose d'exposition

Ce modèle peut varier en fonction du paramètre étudié, ou en fonction du sexe, notamment en ce qui concerne l'atteinte de la zone plateau (zone 2).

La formation des adduits à l'ADN joue un rôle important dans le développement du processus cancéreux et l'apparition des tumeurs (Poirier & Beland, 1992). Il a été montré que la concentration en adduits à l'ADN dans les tissus non tumoraux de patients atteints de cancers du colon et du sein, est plus élevée que dans les tissus équivalents de sujets sains (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1995 ; Li *et al*, 1996). La formation des adduits à l'ADN, en relation avec la dose d'exposition à l'OTA, est mise en évidence par la méthode du post-marquage des adduits au ^{32}P (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1991, 1993c ; Petkova-bocharova *et al*, 1998 ; Miljkovic *et al*, 2002 ; Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005), méthode permettant la détection d'un adduit par 10^9 nucléotides, alors qu'aucun adduit n'est identifié lors de l'utilisation d'OTA marquée radioactivement (Schattler *et al*, 1996 ; Gautier *et al*, 2001A ; Mally *et al*, 2004).

Nous avons recherché la formation d'adduits à l'ADN, par cette méthode, comme marqueur du potentiel génotoxique de l'OTA. Nous avons observé que l'exposition des rats à l'OTA conduit à la formation d'adduits à l'ADN selon une évolution en « cloche » au niveau rénal et hépatique. Le mécanisme par lequel les adduits à l'ADN sont formés est complexe. Il est connu qu'il existe une transition dose dépendante dans les mécanismes de toxicité (Slikker *et al*, 2004), comme présenté sur la figure 30. Cette transition fait intervenir des étapes saturables ou inductibles comme par exemple l'absorption, la distribution (liaison aux protéines et transport), l'élimination, mais également la biotransformation. Deux effets peuvent découler de la métabolisation de l'OTA : une détoxification de la molécule, par exemple quand celle-ci est métabolisée en 4-OH-OTA, ou, au contraire une activation de celle-ci en un métabolite réactif (OTHQ par exemple). Ces deux mécanismes co-existent et peuvent expliquer les résultats différents, et non linéaires, concernant la génotoxicité de l'OTA en fonction de la dose d'exposition.

De plus, les adduits à l'ADN formés pourront être réparés, un déficit dans les mécanismes de réparation de l'ADN augmentant la production d'adduits, la mutagenèse et le risque de cancer (Levy *et al*, 1992). La formation, et la persistance des adduits, résultent d'un équilibre entre leur formation, et de leur élimination (pour une revue, voir Jakóbiśiak *et al*, 2003). La présence d'adduits à l'ADN en quantité trop importante conduit à une saturation des mécanismes de réparation.

Il a été montré dans la littérature que la métabolisation de l'OTA joue un rôle primordial dans l'apparition de la génotoxicité (pour des articles généraux récents voir Pfohl-Leszkowicz & Castegnaro, 2005 ; Manderville, 2005 ; Turesky, 2005). L'expression et l'activité des enzymes de métabolisation sont variables en fonction du sexe, ces enzymes étant sous le contrôle des hormones (Gustafsson *et al*, 1983). Le CYP 2C, notamment, est une époxygénase, dont la régulation et l'activité sont différentes en fonction du sexe (Zhou *et al*, 2005). Les rats Dark Agouty mâles et femelles, utilisés dans notre étude, expriment deux isoformes de CYP 2C différents. Les rats mâles expriment le CYP 2C11 ayant la fonction époxygénase, alors que les femelles expriment le CYP 2C12 dont la propriété est d'hydroxyler les coumarines (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1998). Ce potentiel métabolique différent peut expliquer la plus grande susceptibilité des mâles aux effets carcinogènes de l'OTA. En effet, il a été montré récemment que l'expression de certains variants alléliques de CYP 2C est corrélée avec une augmentation de la fréquence de BEN (Atanasova *et al*, 2005).

Au cours de notre étude, nous avons observé d'importantes différences, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, dans la métabolisation au niveau rénal et hépatique entre mâles et femelles. Nous avons entre autres observé la formation d'OTHQ au niveau rénal spécifiquement chez les rats mâles. Ce dérivé a été décrit dans plusieurs études comme pouvant jouer un rôle dans la génotoxicité de l'OTA (Dai *et al*, 2002 ; Manderville, 2005 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2006 ; Faucet *et al*, 2006). Au niveau rénal et hépatique, nous avons observé une adduction à l'ADN selon un effet « en cloche » en fonction de l'exposition à l'OTA, aussi bien chez les rats mâles que chez les rats femelles. La réduction de l'exposition des rats à l'OTA par le traitement Oxygreen® se traduit par une modulation de la formation des métabolites, ainsi que de celle des adduits à l'ADN, selon un schéma

identique à celui présenté précédemment (figure 24). On observe une augmentation du nombre d'adduits et de certains métabolites quand l'exposition des rats avant application du traitement Oxygreen® se situe dans la zone 3 figurée sur le schéma, aucune modification quand on se situe dans la zone 2 et une diminution quand on se situe dans la zone 1.

La diminution de l'exposition des rats se traduit par une augmentation de l'excrétion urinaire de certains métabolites chez le rat.

En résumé, cette étude confirme les différences de sensibilité à l'OTA qui existent en fonction du sexe (Castegnaro *et al*, 1998 ; Dietrich *et al*, 2001). Ces différences se manifestent tant du point de vue de la toxicocinétique de l'OTA, que du point de vue de sa métabolisation, de son excrétion urinaire et de l'expression de sa toxicité. Ces différences peuvent être mises en parallèle avec l'existence de protéines ayant une affinité différente pour l'OTA en fonction du sexe (Heussner *et al*, 2001), par la présence de transporteurs contrôlés par des hormones, et par l'expression de gènes différents intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la régulation osmotique (Paolini *et al*, 1999 ; Rinn *et al*, 2004).

Cette étude, mimant une exposition de l'homme à l'OTA, en terme de dose d'exposition et de voie d'administration, permet d'apporter des éléments supplémentaires pour la détermination de la dose tolérable journalière en OTA chez l'homme.

La diminution de l'exposition des rats à l'OTA, par l'application du traitement Oxygreen® sur le blé, n'est pas suffisante pour observer une réduction des effets toxiques observés conséquemment à l'exposition à l'OTA.

Perspectives

Nous avons mis en évidence, au cours d'une étude *in vitro*, le potentiel génotoxique d'extraits de blé pré-germé. L'identification des molécules, présentes dans ces blés pré-germés, responsables de l'apparition de ces effets génotoxiques, pourrait permettre d'évaluer leur effet global. Une étude bibliographique nous a amené à envisager l'implication des acides hydroxamiques dans la survenue de ce potentiel génotoxique. Ces blés pré-germés, non utilisables en panification, sont actuellement dirigés vers l'alimentation animale. Il serait intéressant de confirmer que l'ingestion de tels blés ne conduit pas *in vivo* à l'apparition de phénomènes génotoxiques.

Lors de l'étude de l'exposition subchronique à l'OTA, nous avons mis en évidence des différences, spécifiques du sexe et des organes, pour la métabolisation de l'OTA. Comme nous avons confirmé également des différences, spécifiques du sexe et des organes, sur le potentiel génotoxique de l'OTA, il serait intéressant d'identifier les métabolites observés, et d'étudier si une relation existe entre la présence d'un métabolite et la formation spécifique d'un adduit à l'ADN. De plus, il serait pertinent d'étudier l'expression des enzymes de métabolisation induites par l'exposition des rats à l'OTA, afin d'expliquer les différences observées entre mâles et femelles. Ce travail a été entrepris, notamment en ce qui concerne l'expression des COX/LOX et CYP2C, cependant nous n'avons pu obtenir à ce jour de résultats exploitables.

Notre étude révèle que les effets toxiques de l'OTA sont observés pour des doses d'expositions inférieures à celles qui ont été prises comme référence de la dose sans effet, elle-même utilisée pour la détermination de la dose journalière tolérable chez l'homme. Il serait nécessaire de tenir compte de ces données, et de voir sur une étude à long terme si ces doses génèrent des effets toxiques sur des modèles animaux plus proches de l'homme.

L'optimisation du procédé Oxygreen® relève en premier lieu des applications technologiques identifiées par l'entreprise. Il va de soi que le procédé devra être optimisé pour l'atteinte des objectifs définis, et il faudra également tenir compte des résultats de cette étude. L'étude menée *in vitro* montre que le procédé Oxygreen® ne génère ni cytotoxicité, ni génotoxicité, quand celui-ci est appliqué sur un blé de bonne qualité. Mais, si le procédé permet de diminuer l'exposition à l'OTA, nous n'avons pas

de preuve qu'il entraîne une baisse du potentiel toxique de cette mycotoxine. Il paraît donc important, du point de vue du développement commercial du procédé, qu'il soit appliqué à des blés de bonne qualité et qu'il ne soit pas utilisé pour améliorer des blés considérés comme indésirables, que ce soit pour des raisons de temps de chute de Hagberg, ou contamination en mycotoxines. L'industriel a déjà identifié que la qualité du blé (temps de chute de Hagberg, teneur en eau, propreté générale, teneur en protéines) est très importante, et que les résultats du procédé Oxygreen® sont d'autant meilleurs que ces qualités des blés sont optimales. En conséquence, l'objectif de l'utilisation du procédé Oxygreen® n'est pas de se substituer aux efforts de la filière céréalière, mais d'améliorer la qualité des produits finis. Il sera donc important de trouver les conditions optimales d'ozonation qui réduisent au maximum la quantité de mycotoxines en entraînant le moins d'effets par ailleurs.

En situation industrielle, ce procédé sera doté d'automatismes et de mécanismes permettant d'affiner les caractéristiques du traitement. Les configurations des réacteurs industriels conduiront à une amélioration du taux de transfert de l'ozone. En conséquence, les temps de traitement seront plus courts. De plus, la maîtrise des interactions entre l'humidification des grains et le traitement à l'ozone permettra de produire des grains traités de manière plus précise. Dans ces conditions industrielles, des quantités importantes de blé traité pourront être produites, ce qui pourra conduire à réaliser des études complémentaires confirmant l'innocuité de ce procédé *in vivo*, notamment sur des espèces plus proches de l'homme comme le porc.

Pendant que nous réalisons ces travaux, l'industriel a établi que le procédé Oxygreen® permet de détacher le péricarpe du grain, péricarpe facilement séparable industriellement par un simple tarare. Un brevet a été déposé le 20 mars 2006 (Nouveau procédé de dépelliculage du grain de blé, dépôt FR 0650952). Un grain débarrassé du péricarpe a des avantages technologiques (process meunier), nutritionnels (farines enrichies en fibres avec moins de lignine), et permet une décontamination supplémentaire du blé. Il permet aussi de réaliser des produits spécifiques de fractionnement du blé. Le grain « nu » (sans le péricarpe) pourra être utilisé pour les études *in vivo* sur le porc, visant à confirmer l'innocuité du procédé.

Une meilleure compréhension des qualités requises pour que la matrice puisse être soumise au procédé Oxygreen® offrira aussi l'opportunité d'élargir l'utilisation du procédé à d'autres céréales.

- [1]. Abouzied, M.M., Horvath, A.D., Podlesny, P.M., regina, N.P., metodiev, V.D., kamenova-Tozeva, R.M., Niagolova, N.D., Stein, A.D., Petropoulos, E.A., and Ganev, V.S. (2002), Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy, Food Additives and Contaminants, 19, 755-764.
- [2]. Abramson D, Hulasare R, White NDG, Jayas DS, Marquardt RR.(1999), Mycotoxin formation in hullness barley during granary storage at 15% and 19% moisture content. Journal of Stored Products Research 35:297–305.
- [3]. Abrunhosa, L., Serra, R., Venancio, A., (2002), Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. J. Agric. Food Chem. 50, 7493– 7496.
- [4]. Akiyama, H., Toyoda, M., Kato, M., Igimi, S., Kumagai, S., (1997), The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora cultured by continuous flow culture system. Mycotoxins 44, 21– 27.
- [5]. Allen, B., Wu, J., Doan, H., (2003) Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone, J. Environ. Sci. B., 38, 617-630.
- [6]. Ambrose, A. M., and De Eds, F, (1945), Acute and subacute toxicity of citrinin, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 59, 289-291.
- [7]. Ambrose, A. M., and De Eds, F, (1946), Some toxicological and pharmacological properties of citrinin, J. Pharmacol. Exp. Ther., 88, 173-186.
- [8]. Amidon, G.L., and Lee, H.J., (1994), Absorption of peptide and peptidomimetic drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 34, 321–341.
- [9]. Andrzejewski, P., Kasprzyk-Hordern, B., and Nawrocki, J., (2005) The hazard of N-nitrosodimethylamine (NMDA) formation during water disinfection with strong oxidants, Desalination, 176, 37-45.
- [10]. Annis, P., (1990), Requirements for fumigation and controlled atmospheres as options for pest and quality control in stored grain; In : champ, B.R., Highley, E., & Banks, H.J., eds, Fumigation and Controlled Atmosphere Storage of Grain, Canberra, ACT, Australian Center for International Agricultural Research, 20-28.
- [11]. Antoine, C., Lullien-Pellerin, V., Abecassis, J., and Rouau, X., (2002), Intérêt nutritionnel de la couche à aleurone du grain de blé, Sciences des Aliments, 22, 545, 556.
- [12]. Araguas, C., Gonzalez-Penas, E., Lopez de Cerain, A., (2005), Study on Ochratoxin A in cereal-derived products from Spain, Food Chem., 92 , 459-464.
- [13]. Atanasova, S.Y., Von Ahsen, N., Toncheva, D.I., Dimitrov, T.G., Oellerich, M., and Armstrong, V.W., (2005), Genetic polymorphisms of cytochrome P450 among patients with Balkan Endemic Nephropathy (BEN), Clinical Biochemistry, 38, 223-228.
- [14]. Azemar, B. (2000), Etude du rôle de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanismes moléculaires impliqués. thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse 244p.
- [15]. Azemar, B., Pinelli, E., Escourrou, G., Plante, P., and Pfohl-Leszkowicz, A. (1997), Evidence that DNA adducts in some human kidney tumours in France are related to ochratoxin A. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 379, S157.
- [16]. Aziz, N. H., and Moussa, L. A. A., (2002), Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits, Food Control, 13, 281-288.
- [17]. Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Enomoto, A., Tojo, A., Cha, S. H., Sekine, T., Sakthisekaran, D., and Endou, H. (2002), Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1590, 64-75.
- [18]. Bach, R. D., and Su, M.D., (1994), Oxidation of Amines and Sulfides with Hydrogen Peroxide and Alkyl Hydrogen Peroxide. The Nature of the Oxygen-Transfer Step. Journal of the American Chemical Society 116: 5379-5391.
- [19]. Bahneman, E., Kerling, H.P., Ensminger, S., Schwerdt, G., Sibernagl, S., and Gekle, M., (1997), Renal transepithelial secretion of OTA in the non filtering toad kidney, Toxicology, 120, 11-17.
- [20]. Bailey, J.S., Buhr, R.J., Cox, N.A., and Berrang, M.E., (1996) Effect of hatching cabinet sanitation treatments on *Salmonella* cross-contamination and hatchability of broiler eggs. Poultry Sciences, 75, 191-196.
- [21]. Baranovskaya, V.A., Zapol'skii, O.B., Ovrutskaya, I.Y., Obodovskaya, N.N., Pschenichnaya, E.E., and Yushkevich, O.I., (1979) Use of ozone gas sterilization during storage of potatoes and vegetables. Konservn. Ovoshchesus. Promst', 4, 10-12.
- [22]. Bata, A., and Lasztity, R., (1999), Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. Trends Food Sci. Technol. 10, 223– 228.
- [23]. Baudrimont, I., Murn, M., Betbeder, A.M., Guilcher, J., and Creppy, E.E., (1995), Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats, Toxicology, 95, &47-154.
- [24]. Bauer, J., Niemiec, J., and Scholtyssec, S., (1988) Ochratoxin A in der legehennen futter. 2 Mitteilung : Rückstände in serum, leber und ei. Arch. Geflügelkd, 52, 71-75.
- [25]. Baxter, E.D., 1996, The fate of ochratoxin A during malting and brewing, Food Additives and Contaminants, 13, 23-24.
- [26]. Bazarova, V.I., (1982) Use of ozone in storage of apples, Food Sci. Technol. Abstr., 14: 11, J1653.
- [27]. Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2004), Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. Journal of Applied Microbiology, 97, 1038–1044.

- [28]. Belli, N., Pardo, E., Marin, S., Farre, G., Ramos, A.J., and Sanchis, V., (2004) Occurrence of Ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes, *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, 84, 541-546.
- [29]. Bendele, A. M., Neal, S. B., Oberly, T. J., Thompson, C. Z., Bewsey, B. J., Hill, L. E., Rexroat, M. A., Carlton, W. W., and Probst, G. S. (1985a), Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food and Chemical Toxicology* 23, 911-918.
- [30]. Bendele, A. M., Carlton, W. W., Krogh, P., and Lillehoj, E. B. (1985b), Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J x C3H) F1 mouse. *J. Nat.Cancer Inst.* 75, 733-739.
- [31]. Benesic, A., Mildenerger, S., and Gekle, M., (2000), Nephritogenic Ochratoxin A interferes with hormonal signalling of immortalized human kidney epithelial cells, *Pflügers Arch.*, 278-287.
- [32]. Benesic, A., Schwerdt, G., Mildenerger, S., Freudinger, R., Gordjani, N., and Gekle, M., (2005), Disturbed Ca²⁺-signaling by chloroacetaldehyde: a possible cause for chronic ifosfamide nephrotoxicity, *Kidney Int.*, 68, 2029-2041.
- [33]. Bennet, J.W. and Klich, M., (2003), *Mycotoxins*, American Society for Microbiology, 16, 497-516.
- [34]. Berger, V., Gabriel, A.F., Sergeant, T., Trouet, A., Larondelle, Y., and Schneider, Y-J., (2003), Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2), *Toxicology Letters*, 140, 465-476.
- [35]. Betina, V., (1994) *Bioactive secondary metabolite of microorganisms*. Progress in industrial microbiology, Elsevier.
- [36]. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Bennett JW., (1991), Biological detoxification of mycotoxins. In: Smith, JE, Henderson, RS, eds. *Mycotoxins and Animal Foods*, Boston: CRC Press, 816-826.
- [37]. Biró, K., Sólti, L., Barna-Vetró, I., Bagó, G., Glávits, R., Szabó, E., and Fink-Gremmels, J., (2002), Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens, *Avian Pathology*, 31, 141-148.
- [38]. Blank, R., Rolfs, J-P., Südekum, K-H, Frohlich, A.A., Marquardt, R.R., and Wolfram, S., (2003), Effects of Chronic Ingestion of Ochratoxin A on Blood levels and Excretion of the Mycotoxin in Sheep, *J. Of Agric. Food Chem.*, 51, 6899-6905.
- [39]. Blazer-Yost, B.L., West, T.A., Stack, J., Peck, K., Lahr, T.F., and Gekle, M., (2005), Effect of the mycotoxin, ochratoxin A, on hormone-stimulated transport in a cultured cell model of the renal principal cell, *Pflügers Archives*, 450, 53-60.
- [40]. Blesa, J., Soriano, J.M., Molto, J.C., and Manes, J., (2004), Concentration of Ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain), *Journal of Chromatography A*, 1054, 397-401.
- [41]. Böhm, J., Grajewski, J., Asperger, H., Cecon, B., Rabus, B., Razzazi, E., (2000), Study on biodegradation of some A- and B trichothecenes and ochratoxin A by use of probiotic microorganisms. *Mycotoxin Res.* 16A, 70-74.
- [42]. Boorman, G. A. (1989), NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A. Boorman eds. NIH publications n°89-2813, US dept.of health and human services.National Institute of Health, research triangle park, NC.
- [43]. Boudra, H, Le Bars, P & Le Bars, J., (1995), Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 1156-1158.
- [44]. Bourgeois, J.C., and Larpent, J.P., (1996), *Microbiologie alimentaire Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires* (2° éd.), eds Lavoisier, Paris.
- [45]. Breitholz-Emmanuelson, A., Fuchs, R., Hult, K., and Apelgren, L.E., (1992), Syntheses of ¹⁴C-ochratoxin A and ¹⁴C-ochratoxin B and a comparative study of their distribution in rats using whole-body autoradiography., *Pharmacol. Toxicol.*, 70, 255-261.
- [46]. Breitholtz-Emmanuelson, A., Olsen, M., Oskarsson, A., Palminger, I., and Hult, K., (1993), Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *Journal of the association of Official analytical chemists*, 76, 842-846.
- [47]. Brera, C., Caputi, R., Miraglia, M., Iavicoli, I., Salerno, A., Carelli, G., (2002), Exposure assessment to mycotoxins in workplaces : aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera, *Microchemical Journal* 73, 167-173
- [48]. Brera, C., Soriano, J.M., Debegnach, F., and Miraglia, M., (2005), Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal*, 79, 109-113.
- [49]. Broadwater, W.T., Hoehn, R.C., and King, P.H., (1973), Sensitivity of three selected bacterial species to ozone, *Applied Microbiology*, 26, 391-393.
- [50]. Bruinink, A., Rasonyi, T., and Sidler, C., (1997), Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. *In vitro* effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell culture, *Toxicology*, 118, 205-210.
- [51]. Buchman, C.A., Nersesyan, A., Kopp, B., Schauburger, D., Darroudi, F., Grummt, T., Krupitza, G., Kundi, M., Schulte-Hermann, R., and Knasmueller, S., (2006), Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA), and 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA), two naturally occurring benzoxazinones contained in sprouts of gramineae are potent aneugens in human-derived liver cells (Hep G2), *Cancer letters*, 1-10, sous presse.
- [52]. Burleson, G.R., Murray, T.M., and pollard, M. (1975) Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication, *Applied Microbiology*, 29, 340-344.
- [53]. CAC, (1989), Codex Alimentarius Comission, Répertoire des Auxiliaires Technologiques, CAC/MISC, http://www.ipfsaph.org/cds_upload/kopool_data/codex_0/fr_cxa_003f.pdf

- [54]. Camacho, N.A., and Aguilar, O.G., (2003), Production, purification, and characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus* sp. and its application in baking, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104, 159-172.
- [55]. Campos, A.C., Losada, V., Rodriguez, O., Aubourg, S.P., and Barros-Velazquez, J., (2006), Evaluation of an ozone-slurry ice combined refrigeration system for the storage of farmed turbot (*Psetta maxima*), *Food Chemistry*, 97, 223-230.
- [56]. CAST (1989), *Mycotoxins and health risks*. Rep. 116. Ames, IOWA, USA.
- [57]. CAST (2003) *Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems*, Task force report, n°139, ISBN N° 1-887383-22-0, pp 200, Ames IOWA, USA.
- [58]. Castegnaro, M., Bartsch, H., and Chernozemsky, I. N. (1987), Endemic nephropathy and urinary tract tumors in the Balkans. *Cancer Research*, 47, 3608-3609.
- [59]. Castegnaro, M., Bartsch, H., Bereziat, J.C., Arvela, P., Michelon, J., and Broussolle, L., (1989), Polymorphic ochratoxin A hydroxylation in rat strains phenotyped as poor and extensive metabolizers of debrisoquine, *Xenobiotica*, 19, 225-230.
- [60]. Castegnaro, M., Barek, J., Fremy, J.-M., Lafontaine, M. Miraglia, M., Sansone, E.B., Telling, G.M., (1991), Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: Some mycotoxins, IARC Scientific Publications No. 113. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- [61]. Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl-Leschkowicz, A., Esteve, J., Steinmann, J., Tillmann, T., Michelon, J., and Bartsch, H., (1998), Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International Journal Of Cancer*. *Journal International Du Cancer* 77, 70-75.
- [62]. Castegnaro M., Canadas D., Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky, IN, Pfohl-Leschkowicz A., (2006a), Potential role of ochratoxin A in Balkan endemic nephropathy: experience in the balkans. *Molecular Nutrition Food Research* (sous presse)
- [63]. Castegnaro M., Tozlovanu M., Wild C., Molinić, A., Sylla, A., Pfohl-Leschkowicz, A. (2006b) Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Molecular Nutrition Food Research* (sous presse).
- [64]. Castells, M., Mari'n, S., Sanchis, V., and Ramos, A.J., (2005), Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review, *Food Additives and contaminants*, 22, 150-157.
- [65]. Castillo, A., Mc Kenzie, K.S., Lucia, L.M., Acuffi, G.R., (2003), Ozone treatment for reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* serotype typhimurium on beef carcass surfaces, *Journal of Food Protection*, 66, 775-779.
- [66]. Ceović, S., Pleština, R., Miltetić-Medved, M., Stavljenić, A., Mitar, J., Vukelić, M., (1991), Epidemiological aspects of Balkan endemic nephropathy in a typical focus in Yugoslavia. In : Castegnaro, M., Pleština, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., Bartsch, H., editors. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. Lyon : IARC, 5-10.
- [67]. CFR (Code of Federal Regulations), (1997), Air contaminants. Title 29, vol.6, Part 1910. Office Federal Register, Washington DC.
- [68]. Chelkowski, J., Golinski, P., Godlewska, B., Radomyska, W., Szebiotko, K., and Wiewiorowska, M., (1981a), Mycotoxins in cereal grain. Part 4. Inactivation of Ochratoxin A and other mycotoxins during ammoniation. *Die Nahrung* 25 631-637.
- [69]. Chelkowski, J., Golinski, P., and Szebiotko, (1981b), Mycotoxins in cereal grain. The fate of ochratoxin A after processing of wheat and barley grain. *Nahrung*, 25, 423-426
- [70]. Chernozemsky, I. N., Stoyanov, I. S., Petkova-Bocharova, T. K., Nicolov, I. G., Draganov, I. V., Stoichev, I. I., Tanchev, Y., Naidenov, D., and Kalcheva, N. D., (1977), Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratza district, Bulgaria. *International Journal Of Cancer*. *Journal International Du Cancer* 19, 1-11.
- [71]. Chong, X., and Rahimtula, A.D., (1992) Alteration in ATP dependent calcium uptake by rat renal cortex microsomes following ochratoxin A administration in vivo or addition in vitro, *Biochem. Pharmacol.* 44 ,1401-1409.
- [72]. Chu, F.S., Chang, C.C., Ashoor, S.H., and Prentice, N., (1975), Stability of Aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. *Appl. Microbiol.*, 29, 313-316.
- [73]. Copaja, S.V., Nicol, D., and Wratten, S.D., (1999), Accumulation of hydroxamic acids during wheat germination, *Phytochemistry*, 50, 17-24.
- [74]. Creppy, E. E., Kern, D., Steyn, P. S., Vleggaar, R., Roschenthaler, R., and Dirheimer, G. (1983a), 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* 19, 217-224.
- [75]. Creppy, E. E., Stormer, F. C., Kern, D., Roschenthaler, R., and Dirheimer, G. (1983b), Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and *in vivo* protein synthesis of hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions* 47, 239-247.
- [76]. Creppy, E.E., Kane, A., Dirheimer, G., Lafarge-Frayssinet, C., Mousset, S., and Frayssinet, Ch., (1985) Genotoxicity of ochratoxin A in mice, DNA single-strand break evaluation in spleen, liver, and kidney, *Toxicology Letters*, 28, 29-35.
- [77]. Creppy, E.E., Castegnaro, M., grosse, Y., Mériaux, J., (1993) Etude de l'ochratoxicose humaine dans trios régions de France : Alsace, Aquitaine, Rhone-Alpes. In : Creppy, E.E., castegnaro, M., and Dirheimer, G., eds. *Human ochratoxicosis and its pathologies*, John libbey Eurotext Ltd, 231, 147-158.
- [78]. Creppy, E.E., Baudrimont, I., Betbeder, A.M., (1995), Prevention of nephrotoxicity of Ochratoxin A, a food contaminant, *Toxicology letters*, 82/83, 869-877.

- [79]. Cuero, R.G., and Smith, J.E., (1987), Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium veridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. Trans. Br. Mycol. Soc., 2, 221-226.
- [80]. Curtui, V.G., Gareis, M., Usleber, E., and Märklbauer, E., (2001), Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B and Zearalenone, Food Additives and Contaminants, 18, 730-738.
- [81]. D'Mello, J.P.F., and Mc Donald, A.M.C., (1997), Mycotoxins. Animal Feed Sciences technology, 69, 155-166.
- [82]. Dahlmann, A., Dantzer, W.H., Silbernagl, S., and Gekle, M., (1998), Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron *in vivo* : the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 286, 157-162.
- [83]. Dai, J., Park, G., Wright, M. W., Adams, M., Akman, S. A., and Manderville, R. A., (2002), Detection and characterization of a glutathione conjugate of ochratoxin A. Chemical Research In Toxicology 15, 1581-1588.
- [84]. Daugherty, A.L., and Mrsny, R.J., (1999), Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier. Part one. Pharm. Sci. Tech. Today, 2, 144-151.
- [85]. Dave, S., Kim, J.G., Lou, Y., and Yousef, A.E., (1998), Kinetics of inactivation of *Salmonella enteritidis* by ozone, Institute of Food Technologists annual Meeting, book of abstract, p15.
- [86]. De Groene, E.M., Hassing, I.G., Blom, M.J., Steiner, W., Fink-Gremmels, J., and Horbach, G.J., (1996a), development of human Cytochrome P450 expressing cell lines : application in mutagenicity testing of Ochratoxin A, Cancer Res., 56 : 299.
- [87]. De Groene, E.M., Jahn, A., Horbach, G.J., and fink-Gremmels, J., (1996b), Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxins Ochratoxin A, Environmental Toxicology and Pharmacology, 1, 21-26.
- [88]. Deberghes, P., Betbeder, A.M., Boisard, F., Blanc, Rh., Delaby, J.F., Krivobok, S., Steiman, Rh., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., (1995), Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. Mycotoxin Res. 11, 37- 47.
- [89]. Degen, G.H., Gerber, M.M., Obrecht, S., Leszkowicz, A., and Dirheimer, G., (1994), Genotoxicity and cytotoxicity of Ochratoxin A in bovine seminal vesicle cell cultures, Arch. Pharmacology, 349, 121.
- [90]. Degen, G.H., Gerber, M.M., Obrecht-Pflumio, S., and Dirheimer, G., (1997) Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cells, Arch. Toxicol., 71, 375-371.
- [91]. Delacruz, L., and bach, P.H., (1990), The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity, J. Biopharm. Sci., 1, 277-304.
- [92]. Di paolo, N., Guarnieri, A., Loi, F., Sacchi, G., Mangiarotti, A.M., and Di Paolo, M., (1993), Acute renal failure from inhalation of mycotoxins, Nephron, 64, 621-625.
- [93]. Dietrich, D.R., O'Brien, E., Stack, M.E., and Heussner, A.H., (2001), Species- and sex-specific renal cytotoxicity of ochratoxin A and B in vitro, Exp. Toxic. Pathol., 53, 215-225.
- [94]. Dollear, F.G., Mann, G.E., Codifer, L.P., Gardner, H.K., Koltun, S.P., and Vix, H.L.E., (1968), Elimination of Aflatoxins from peanut meal, The journal of the American Oil chemists society, 45, 862-865.
- [95]. Dondo, A.C., Nachtman, C., Doglione, L., Rosso, A., and Genetti, A., (1992) Foods; their preservation by combined use of refrigeration and ozone, Ing. Aliment. Conserve Anim., 8, 16-25.
- [96]. Dönmez-Altuntas, H., Hamurcu, Z., Imamoglu, N., and Cem Liman, B., (2003), Effects of ochratoxin A on micronucleus frequency in human lymphocytes, Nahrung food, 1, 33-35.
- [97]. Dortant, P. M., Peters-Volleberg, G. W. M., Van Loveren, H., Marquardt, R. R., and Speijers, G. J. A. (2001), Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. Food and Chemical Toxicology 39, 55-65.
- [98]. Dresser, M.J., Leabman, M.K., Giacomini, K.M., (2000), Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. J. Pharm. Sci. 90, 397-421.
- [99]. Dubois, M., Coste, C., Després, A.G., Efstathiou, T., Nio, C., Dumont, E., and Parent-Massin, D., (2006), Safety of Oxygreen®, an ozone treatment on wheat grains. Part 2. Is there a substantial equivalence between Oxygreen®-treated grains and untreated grains?, Food Additives and Contaminants, 23, 1-15.
- [100]. Dwarakanath, C.T., Rayner E.T., Mann G.E., Dollear F.G., (1968), Reduction of Aflatoxin Levels in Cottonseed and Peanut Meals by Ozonisation. Journal of American Oil Chemist's Society 45:93-95.
- [101]. Eder, S., Benesic, A., freudinger, R., Engert, J., Schwerdt, G., Drumm, K., and Gekle, M., (2000), Nephritogenic Ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells, Pflügers Arch. Eur. J. Physiol., 440, 521-529.
- [102]. Ehrlich, V., Darroubi, F., Uhl, M., Steinkellner, H., Gann, M., Majer, B.J., Eisenbauer, M., and Knasmüller, S., (2002), Genotoxic effects of ochratoxin A in human derived hepatoma (HepG2) cells, Food and Chemical Toxicology, 40, 1085-1090.
- [103]. El Adlouni, C., Pinelli, E., Azemar, B., Zaoui, D., Beaune, P., and Pfohl-Leszkowicz, A., (2000), Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. Environmental And Molecular Mutagenesis, 35, 123-131.
- [104]. El Bazza, E.M.Z., Farrag, A.H., El-Fouly, E.D.Z.M., and El-Tablawi, Y.M.S., (2001), Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigella sativa* seeds oil on growth, spore germination and toxin production fungi, Radiation physics and Chemistry, 60, 181-189.
- [105]. Elford, W.J., and Ende, J.V.D., (1942), An investigation of the merits of ozone as an aerial disinfectant, J. Hyg., 42, 240-265.

- [106]. Elling, F., Hald, B., Jacobsen, C., and Krogh, P., (1975), Spontaneous cases of toxic nephropathy in poultry associated with Ochratoxin A, *Acta Path. Micro. Sc. Section A*, 83, 739-741.
- [107]. Elling, F., Nielsen, J. P., Lillehoj, E. B., Thomassen, M. S., and Stormer, F. C. (1985), Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: Enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicon* 23, 247-254.
- [108]. Engelhardt, G., (2002), Degradation of ochratoxin A and B by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Mycotoxin Res.* 18, 37– 43.
- [109]. Ewell, A.W., (1946), Recent ozone investigation, *J. Appl. Physics*, 17, 908-911.
- [110]. Faitel' Berg-Blank, V.R., Bykove, E.V., Orlova, A.V., Ostapenko, L.G., and Stepanenko, V.A., (1979), Improvement of keeping quality of potatoes and onions by means of ionized air, *Vestn. S'kh. Nauki*, 4, 110-112.
- [111]. FAO/WHO, (2000), Proposed Draft Code of Practice for the Prevention of Contamination by Ochratoxin A in Cereals, Codex Alimentarius Commission, CX/FAC 00/17.
- [112]. Farrar, J.J., and Davis, R.M., (1991), Relationship among ear morphology, western flowers thrips and *Fusarium* ear rot of corn, *Phytopathology*, 81, 661-666.
- [113]. Faucet-Marquis, V., (2005), L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au ³²P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A, mémoire de thèse, INP, Toulouse.
- [114]. Faucet V., Pfohl-Leszkowicz A., Dai J., Castegnaro M., and Manderville R.A., (2004), Evidence for covalent DNA adduction by ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chemical Research In Toxicology*, 17:1289-1296.
- [115]. Faucet-Marquis V., Canadas D., Manderville R. and Pfohl-Leszkowicz A. (2005), Genotoxic potential of OTHQ (quinone form of ochratoxin A), *in vitro*. Comparison of OTA DNA adducts formed *in vitro* and *in vivo*. *Chem Res in Toxicology* (soumis)
- [116]. Faucet-Marquis V., Pont, F., Størmer F.C., Rizk T., Castegnaro M., and Pfohl-Leszkowicz A., (2006), Evidence of a new dechlorinated OTA derivative formed in opossum kidney cell cultures after pre-treatment by modulators of glutathione pathways. Correlation with DNA adduct formation, sous presse.
- [117]. FDA (1982) GRAS status of ozone. *Fed. Reg.* 47, 50209-50210.
- [118]. Feillet, P., (2000), Le grain de blé, composition et utilisation, INRA, Paris.
- [119]. Ferrufino-Guardia, E.V., Tangni, E.K., Larondelle, Y., and Ponchaut, S., (2000), Transfer of ochratoxin A during lactation : exposure of suckling via the milk of rabbit does fed a naturally-contaminated feed, *Food Additives and contaminants*, 17, 167-175.
- [120]. Fetner, R.H., (1958), Chromosome breakage in *Vicia faba* by ozone, *Nature*, 181, 504-505.
- [121]. Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kuhn, H., and Wasternack, C., (1997), Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. Implication of lipid body lipoxigenase in lipid mobilization during germination, *J. Biol. Chem.*, 272, 21635-21641.
- [122]. Filtenborg, O., Frisvad, J.C., and Thrane, U., (1996), Moulds in food spoilage, *international journal of food Microbiology*, 33, 85-102.
- [123]. Follmann, W., Hillebrand, I.E., Creppy, E.E., and Bolt, H.M., (1995), Sister exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with Ochratoxin A and alpha, *Archives of Toxicology*, 77, 298-304.
- [124]. Fournaud, J. and Lauret, R., (1972), Influence of ozone on the surface microbial flora of frozen beef and during thawing, *Ind. Aliment. Agric.*, 89, 585-589.
- [125]. Fuchs, R., Apelgren, L.E., and Hult, K., (1988a), Distribution of ¹⁴C-ochratoxin A in the mouse monitored by whole-body autoradiography. *Pharmacol. Toxicol.*, 63, 355-360.
- [126]. Fuchs, R., Radic, B., Ceovic, S., Sostaric, B., and Hult, K. (1988b), Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats. *Period.Biol.* 90, 39-42.
- [127]. Gabriel'yants', M.A., Teplova, L.N., Karpova, T.I., Kozlova, R.A., and Makarova, G.F., (1980), Storage of hard rennet cheeses in cold stores with ozonization of air, *Kholodil'naya Technika*, 5, 35-37.
- [128]. Galtier, P., (1978), Contribution of pharmacokinetic studies to mycotoxicology—ochratoxin A, *Vet. Sci. Commun.* 1, 349–358.
- [129]. Galtier, P., (1991), Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals, *IARC Sci. Publ.*, 115, 187-200.
- [130]. Galtier, P., and Alvinerie, M., (1976), In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras, *Ann. Rech. Vet.*, 7, 91-98.
- [131]. Galtier, P., Charpentreau, J. L., Alvinerie, M., and Labouche, C. (1979), The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals* 7, 429-434.
- [132]. Galtier, P., Alvinerie, M., and Charpentreau, J. L. (1981), The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology* 19, 735-738.
- [133]. Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., and Galvano, G., (2001), A review : Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins, *J. of Food . Protec.*, 64, 120-131.
- [134]. Ganapathy, V., Leibach, F.H., (1982), Peptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles. *Life Sci.* 30, 2137–2146.
- [135]. Gareis, M. (1996), Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food Addit Contam.* 13, 35-37.
- [136]. Gautier, J., Richoz, J., Welti, D. H., Markovic, J., Gremaud, E., Guengerich, F. P., and Turesky, R. J., (2001a), Metabolism of ochratoxin A : absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chemical Research, In : Toxicology* 14, 34-45.

- [137]. Gekle, M., Oberleithner, H., and Sibernagl, S., (1993b), Ochratoxin A impairs postproximal nephron function in vivo and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-Darby canine kidney cells in vitro, *Pflügers Arch.*, 19, 225-235.
- [138]. Gekle, M., Vogt, R., Oberleithner, H., and Sibernagl, S., (1994), The mycotoxin ochratoxin A deranges pH homeostasis in madin-Darby canine kidney cells, *J. Membr. Biol.*, 139, 183-190.
- [139]. Gekle, M., Pollock, C.A., and sibernagl, S., (1995) Time- and concentration-dependant biphasic effect of Ochratoxin A on growth of proximal tubular cells in primary culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 397-404.
- [140]. Gekle, M., and Sibernagl, S., (1996), Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a physiopathological approach, *Kidney Blood Press res*, 19, 225-235.
- [141]. Gekle, M., Sauvant, C., Schwerdt, G., and Sibernagl, S., (1998), Tubulotoxic mechanisms of Ochratoxin A, *Kidney Blood Press Res.*, 21, 277-279.
- [142]. Gekle, M., Schwerdt, G., Freudinger, R., mildenberger, S., Wilflingseder, D., Pollack, V., Dander, M., and schramek, H. (2000) Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293, 837-844.
- [143]. Gekle, M., Sauvant, C., and Schwerdt, G., (2005), Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cell, *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 118-130.
- [144]. Girardi A., J., Jensen, F. C., and Koprowski, H., (1965), SV 40-induced transformation of human diploid cells: crisis and recovery. *Journal of Cellular Physiology*, 65, 69-83.
- [145]. Golinski, P., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chelkowski, J., Hult, K., and Kostecki, M., (1991), Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland. *IARC Scientific Publications* 153-158.
- [146]. Gomella, C., (1972), Ozone practice in France, *J. Am. Water works Assoc.*, 64, 39-46.
- [147]. Graham, D. M., (1997), Use of ozone for food processing. *Food Technol.* 51, 72-75.
- [148]. Grosse, Y., Pfeifer, A., Mace, K., Harris, C. C., Dirheimer, G., and Pfohl-Leschkowicz, A. (1994), Biotransformation of ochratoxin a by human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) expressing human cytochrome P450s and implication of glutathione conjugation. *Toxicology Letters* 74, 32-33.
- [149]. Grosse, Y., Castegnaro, M., Macé, K., Bartsch, H., Dirheimer, G., Pinelli, E., Pfeiffer, A., and pfohl-Leschkowicz, A., (1995), Evaluation of ochratoxin A genotoxicity by DNA-adducts detection : cytochrome P450 implicated, *Clinical Chemistry*, 12, 1927-1929.
- [150]. Grosse Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H., and pfohl-Leschkowicz, A., (1997a) Retinol (vitamin A), ascorbic acid (vitamin C) and α tocophérol (vitamin E) prevent DNA adduct formation in mice pretreated with ochratoxin A and Zearalenone, *Cancer letters* 114, 225-229.
- [151]. Grosse, Y., Monje, M.C., Macé, K., Pfeifer, A., and Pfohl-Leschkowicz, A., (1997b), Use of bronchial epithelial cells expressing human Cytochrome P450 for study on metabolism and genotoxicity of Ochratoxin A, *In vitro Toxicology*, 10, 97-107.
- [152]. Groves, C.E., Morales, M., and Wright, S.H., (1998), Peritubular transport of Ochratoxin A in rabbit renal proximal tubules, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284, 943-948.
- [153]. Grunkemeier, A., (1990), Untersuchungen zur Beeinflussung der Rückstandsbildung von Ochratoxin A beim Schwein durch den diätetischen Einsatz von Adsorbentien. PhD thesis, University of Munich, Germany.
- [154]. Guay, C., Rodriguez, M., and Serodes, J., (2005), Using ozonation and chloramination to reduce the formation of trihalomethanes and haloacetic acids in drinking water, *Desalination*, 176, 229-240.
- [155]. Gustafson, J.A., Mode, A., Norstedt, G., and Skett, P., (1983), Sex steroid induced changes in hepatic enzymes, *Annual reviews of Physiology*, 45, 51-60.
- [156]. Güzel-Seydim, Z., Bever, P. I., and Greene A. K., (2004), Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components, *Food Microbiology*, 21, 475-479.
- [157]. Hageberg, S., Hult, K., and Fuchs, R., (1989), Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal Of Applied Toxicology: JAT* 9, 91-96.
- [158]. Hald, B., (1991), Ochratoxin A in human blood in European countries. *IARC Scientific Publications* 159-164.
- [159]. Halliwell B., and Gutteridge J.M.C., (1988), Free radicals and antioxydant protection, mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum.Toxicol.* 7, 7-13.
- [160]. Hamelin, C., and Chung, Y.S., (1975), Characterisation of mucoid mutants of *Escherichia coli* K-12 isolated after exposure to ozone, *J. Bacteriol.*, 122, 19-24.
- [161]. Hansen, C.E., Dueland, S., Drevon, C.A., Stormer, F.C., (1982), Metabolism of ochratoxin A by primary culture of rat hepatocytes, *Applied Environmental Microbiology*. 43, 1267-1271.
- [162]. Haraguchi, T., Simidu, U., and Aiso, K., (1969), Preserving effect of ozone on fish, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 35, 915-919.
- [163]. Harper JM., (1989), Food extruders and their applications. In: Mercier C, Linko L, Harper JM, editor. *Extrusion Cooking*. Minnesota: American Association of Cereal Chemists. p 1-15.
- [164]. Hashimoto, Y., Ishizaki, T. and Shudo, K. (1991) *Tetrahedron* 47, 1837.
- [165]. Hashimoto, Y., and Shudo, K., (1996), Chemistry of biologically active benzoxazinoids, *Phytochemistry*, 43, 551-559.
- [166].
- [167]. Hemminki, K., Koskinen, M., Rajaniemi, H., and Zhao, C., (2000), DNA Adducts, Mutations, and Cancer 2000, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 264-275.
- [168]. Hennig, A., Finks-Gemmels, J., and Leistner, L., (1991), Mutagenecity and effects of Ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. *In* : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G.,

- Chernozemsky, I.N., and Bartsch, H., eds. Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract tumours, IARC Sci. Publ. N° 115, IARC, Lyon, 255-260.
- [169]. Herbold, K., Flehmig, B., and Botzenhart, K., (1989) Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of Hepatitis A virus, poliovirus I, and indicator microorganisms, *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2949-2953.
- [170]. Hetherington, C., and Raistrick, H., (1931), Studies in the biochemistry of micro-organisms. Part 14. On the production and the chemical constitution of the new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum*, *Proc. Roy. Soc., Ser. B.*, 220, 269-295.
- [171]. Heussner, A.H., O'Brien, E., and Dietrich, D.R., (2002), Species- and sex-specific variations in binding of ochratoxin A by renal proteins in vitro, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 54, 151-159.
- [172]. Heussner A.H., Dietrich D.R., and O'Brien E. O, (2006), *In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells *Toxicology in Vitro* 20, 332-341
- [173]. Hietanen, E., Malaveille, C., Camus, A. M., Bereziat, J. C., Brun, G., Castegnaro, M., Michelon, J., Idle, J. R., and Bartsch, H., (1986), Interstrain comparison of hepatic and renal microsomal carcinogen metabolism and liver S9-mediated mutagenicity in DA and Lewis rats phenotyped as poor and extensive metabolizers of debrisoquine. *Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate Of Chemicals* 14, 118-126.
- [174]. Hirota, M., Mehta, M., Yoneyama, K., and Kitabatake, N., (2002), A major decomposition product, citrinin H2, from citrinin on heating with moisture, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66, 206-210.
- [175]. Hoehler, D., Marquardt, R. R., Frohlich, A.A., (1996a) Lipid peroxidation as one mode of action in ochratoxin A toxicity in rats and chicks, *Canadian journal of animal science* ,287-292.
- [176]. Hoehler, D., Marquardt, R.R., McIntosh, A.R., and Xiao, H., (1996b), Free radical generation as induced by Ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*), *J. Biol. Chem.*, 271, 27388-27394.
- [177]. Hoigne, J. and H. Bader (1976), The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions." *Water Research* 10: 377-386.
- [178]. Hoigne, J. and H. Bader (1978), "Ozone initiated oxidations of solutes in wastewater: a reaction kinetic approach." *Progress in Water Technology* 10(5/6): 657-671.
- [179]. Horvath, M., Bilitzky, L., Huttner, J., (1985), Fields of utilization of ozone, p 257-316, in R.J.H. Clark (Ed.), *ozone*, Elsevier Science Publishing Co, Inc., New York.
- [180]. Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., (1992), Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A, *Poultry Science*, 71, 4-69.
- [181]. Huisgen, R., (1963), *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 2, 565-570.
- [182]. Hult, K.A., Teiling, A., Gatenbeck, S., (1976), Degradation of Ochratoxin A by ruminants, *Applied And Environmental Microbiology* 32, 443-444.
- [183]. Hult, K., Hokby, E., Gatenbeck, S., and Rutqvist, L., (1980), Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden: use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Applied And Environmental Microbiology* 39, 828-830.
- [184]. Hult, K., Plestina, R., Habazin-Novak, V., Radic, B., and Ceovic, S., (1982), Ochratoxin A in human blood and Balkan Endemic nephropathy. *Arch.Toxicol.* 51, 313-321.
- [185]. Hult, K., Rutqvist, L., Holmberg, T., Thafvelin, B., and Gatenbeck, S., (1984), Ochratoxin A in blood of slaughter pigs. *Nordisk Veterinaermedicin* 36, 314-316.
- [186]. Huwig, A., Freimund, S., Kappelli, O., and Dutler, H., (2001), Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents, *Toxicology Letters*, 122, 179-188.
- [187]. Hwang, C.-A., and Draughon, F.A., (1994), Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection* 57, 410- 414.
- [188]. Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R., Marinaccio, A., and Miraglia, M., (2002), External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A, *Int. Arch. Occup. Environn. Health*, 75, 381-386.
- [189]. IFBM, Boivin, P., rapport final, L'ochratoxine A, la citrinine, et la sterigmatocystine dans les céréales françaises et leur devenir au cours de procédés de transformations agroalimentaires.
- [190]. Il'ichev, Y. V., Perry, J. L., and Simon, J. D. (2002a), Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Preferential binding of the dianion and the pH effects. *J.Phys.Chem.B* 106, 452-459.
- [191]. Il'ichev, Y. V., Perry, J. L., Ruker, F., Dockal, M., and Simon, J. D. (2002b), Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Binding sites localized by competitive interactions with the native protein and its recombinant fragments. *Chemico-Biological Interactions* 141, 275-293.
- [192]. INRA, (1999), *La lutte Biologique, Les dossiers de l'Environnement n°19*
- [193]. INRA, (2002) Dossier La sécurité des aliments, <http://www.inra.fr/sia2002/secualim02.pdf>.
- [194]. INRA, (2004a) Dossiers INRA, Qualité des aliments, le vin, <http://www.inra.fr/actualites/DOSSIERS/qualite-aliments/vin-microflore-vin.htm>.
- [195]. INRA, (2004b), Dossiers INRA, Qualité des aliments, le fromage, <http://www.inra.fr/actualites/DOSSIERS/qualite-aliments/fromage-microorga-fermentation.htm>.
- [196]. Inui, K., Masuda, S., Saito, H., (2000a). Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int.* 58, 944-958.
- [197]. Inui, K., Terada, T., Masuda, S., Saito, H., (2000b). Physiological and pharmacological implications of peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15 (Suppl. 6), 11-13.
- [198]. Ipsen, R., (1989), Factors affecting the storage of whole milk powder, *Scand. Dairy Ind.*, 3, 24-26.

- [199]. Ishizaki, T., Hashimoto, Y., Shudo, K. and Okamoto, T., (1982) *Tetrahedron Letters* 23, 4055.
- [200]. Jakóbisiak, M., Lasek, W., and Gołab, J., (2003), Natural mechanisms protecting against cancer, *Immunology Letters* 90, 103–122.
- [201]. JECFA (2002), Evaluation of certain mycotoxins. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 906.
- [202]. Jemmali, M., (1979), Decontamination and detoxification of mycotoxins, *Pure Applied Chem.*, 52, 175-181.
- [203]. Joret, J.C., Block, J.C., Hartemann, P., and Richard, Y., (1982), Waste-water disinfection : elimination of fecal bacteria and enteric viruses by ozone, *Ozone Sci; Eng.*, 4, 91-99.
- [204]. Jørgensen, K., (1998), Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A, *Food Additives and Contaminants*, 5, 550-554.
- [205]. Jung, K. Y., Takeda, M., Kim, D. K., Tojo, A., Narikawa, S., Sun Yoo, B., Hosoyamada, M., Ho Cha, S., Sekine, T., Endou, H., (2001), Characterisation of Ochratoxin A transport by human organic anion transporters, *Life Sciences*, 69, 2123-2135.
- [206]. Kamataki, T., Shimada, M., Maeda, K., and Kato, R., (1985), Pituitary regulation of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes of rats, *Biochemical Biophysical Research Communication*, 130, 1247-1253.
- [207]. Kamataki, T., Maeda, K., Yamazoe, Y., Nagai, T., and Kato, R., (1983), Sex difference of cytochrome P-450 in the rat : Purification, characterisation and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225, 758-770.
- [208]. Kane, A., Creppy, E. E., Roschenthaler, R., and Dirheimer, G. (1986a), Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 42, 233-243.
- [209]. Kane, A., Creppy, E. E., Roth, A., Roschenthaler, R., and Dirheimer, G. (1986b), Distribution of the [3H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Archives Of Toxicology* 58, 219-224.
- [210]. Kanisawa, M., (1984), Synergistic effects of citrinine on hepatorenal carcinogenesis of Ochratoxin A in mice, *Dev. Food Sci.*, 7, 245-254.
- [211]. Kanisawa, M., and Suzuki, H., (1975), Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*, 69, 599-600.
- [212]. Kanisawa, M., and Suzuki, S., (1978), Induction of renal and hepatic tumours in mice by ochratoxin A, a mycotoxin, *Gann* 69, 599–600.
- [213]. Kanisawa, M., and Suzuki, H., (1990), The mode of action of ochratoxin A in acute enteritis in rats. *JEPTO* 10, 56-63.
- [214]. Karlovsky, P., (1999), Biological Detoxification of Fungal Toxins and its Use in Plant Breeding, *Feed and Food Production, Natural Toxins*, 7, 1-23.
- [215]. Karnik, B.S., Davies, S.H., Baumann, M.J., and Masten, S.J., (2005), The effects of combined ozonation and filtration on disinfection by-product formation, *Water Research*, 39, 2839-2850.
- [216]. Kerkadi, A., Barrault, C., Marquardt, R., (1999), Cholestyramine protects against Ochratoxin A toxicity: role of Ochratoxin A sorption by the resin and bile acid entero hepatic circulation, *Journal of Food Protection*, 62, 1461-1465.
- [217]. Kessel, J.F., Allison, F.J., Moore, J., and Kairne, M., (1943), Comparison of chlorine and ozone as virucidal agents of poliomyelitis virus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 53, 71-73.
- [218]. Khadre M.A., and Yousef, A.E., (2001), Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study, *Int. J. Food Microbiol.*, 71, 131-138.
- [219]. Kim, J.G., (1998), Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods. PhD Thesis. The Ohio State University, Columbus.
- [220]. Kim, J.G., Yousef, A.E., and Dave, S., (1999), Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods : a review, *Journal of Food Protection*, 62, 1071-1087.
- [221]. Kim, J.G., Yousef, A.E., and Khadre, M.A., (2003), Ozone and its current and future application in the food industry, *Advanced Food Nutrition Research*, 45, 167-218.
- [222]. Kim, R.B., (2002), Transporters and xenobiotic disposition, *Toxicology*, 181-182, 291-297.
- [223]. Kolodyaznaya, V.S., and Suponina, T.A., (1975), Storage of foods using ozone, *Knolodil' naya tekhnika*, 6, 39-41.
- [224]. Kontaxi, M., Eckhardt, U., hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J., and Petzinger, E., (1996), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279, 1507-1513.
- [225]. Kottapalli, B., Wolf-Hall, C.E., Schwarz, P., (2005), Evaluation of gaseous ozone and hydrogen peroxide treatments for reducing *Fusarium* survival in malting barley, *Journal of Food Protection*, 68, 236-240.
- [226]. Krogh, P., (1972), Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan Endemic nephropathy. In: Pulchev, Dinev, Milev, Doichinov. Eds *Endemic Nephropathy*, Sofia, Bulgarian Academy of science 266-270.
- [227]. Krogh, P., (1977), Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. *Nord Vet. Med.*, 29, 402-408.
- [228]. Krogh, P. ed (1987), *Ochratoxin A in food*, New York, Academic Press, 97-121.
- [229]. Krogh, P., Hald, B., and Pedersen, E. J., (1973), Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*. Section B: Microbiology And Immunology 81, 689-695.

- [230]. Krogh, P., Axelsen, N.H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldegaard-Hensen, J., Larsen, A.E., Madsen, A., Mortensen, H.P., Möller, T., Petersen, O.K., Ravnskov, U., rostgaard, M., and Aalund, O. (1974), Experimental porcine nephropathy : Changes of renal function and structure perorally induced by chrystalline Ochratoxin A, *Acta Pathologica Microbiologica scandinavica Section A suppl.* 246, 1-21.
- [231]. Kubicka, E., Grabska, J., Jedrychowski, L., and Czyz, B., (2000), Changes of specific activity of lipase and lipoxygenase during germination of wheat and barley, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51, 301-304.
- [232]. Kuiper-Goodman, T., (1991), Risk assessment *in* : Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N., and Battsch, H., eds. *Mycotoxins, Endemic nephropathy and Urinary tract tumours*, IARC Sci. Publications. N° 115, Lyon, 307-320.
- [233]. Kuiper-Goodman, T., and Scott, P. M. (1989), Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical And Environmental Sciences: BES* 2, 179-248.
- [234]. Kumagai, S., and Aibara, K. (1982), Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 64, 94-102.
- [235]. Kumagai, S., (1985), Ochratoxin A: Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chem. Toxicol.*, 23, 941-943.
- [236]. Kuramochi, G., gekle, M., and Sibernagl, S., (1997), Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increases in pH and HCO₃⁻ in the tubules and vasa recta, *Pflügers arch.*, 434, 392-397.
- [237]. Kusuhara, H., and Sugiyama, Y., (2002), Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs : transporters in the liver, small intestine, brain and kidney, *Journal of Controlled Release*, 78, 43-54.
- [238]. Lacey, J., (1989), Prevention of mould growth and mycotoxins production through control of environmental factors. In : *Mycotoxins and Phycotoxins*, 161-168, Hashimoto, N.K., Ueno, Y., Elsevier eds, Amsterdam.
- [239]. Laciakovà, A., Cabadaj, R., Pàstorová, B., Conková, E., Kovàc, G., and Laciak, V., (1999), the effect of food additives on ochratoxin A, *Folia Veterinaria*, 2, 71-73.
- [240]. Langlais, B., D. A. Reckhow, et al., (1985), *Ozone in Water Treatment: Application and Engineering*, LEWIS.
- [241]. Larondelle, Y., (2005), *Mycotoxines, polyphénols et épithélium intestinal humain : etude in vitro des interactions au niveau de l'absorption et de la métabolisation, communication orale*, Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire, Fes, Maroc.
- [242]. Lataste, C., Guérin, L., Solanet, D., Berger, J.L., Cottureau, P., Molot, B., (2004), Evolution de la contamination en Ochratoxine A : du vignoble francais au vin, *ITV*.
- [243]. Le Bars, J., (1982), Toxinogenesis as a function of the ecological conditions of the grain/microorganisms systems, In : Multon, J., Ed. *Preservation and storage of grains. Seeds and their by-products*. Lavoisier publishing. New york, 347-366.
- [244]. Le Bars, (2002), *Mycotoxines, Mycotoxinogénèse, Vecteur, Prévention*. Les notes ASÉDIS-SO, Hors-série spécial Mycotoxine, pp 13-31.
- [245]. Leblanc, J.C., (2004), *Etude de l'alimentation totale francaise*, INRA.
- [246]. Leiguarda, R.H., Peso, O.A., and Palazzolo, (1949), Bactericidal action of ozone, *Water Pollut. Abstr.* 22:268.
- [247]. Levy, D.D., Groopman, J.D., Lim, S.E., Seidman, M.M., and Kramer, K.H., (1992), Sequence specificity of aflatoxin BI -induced mutations in a plasmid replicated in *xeroderma pigmentosum* and DNA repair proficient human cells. *Cancer Res.* 52:5668-5673.
- [248]. Lewis, L., Zhuang, H., Payne, F.A., and Barth, M.M., (1996), Betacarotène content and color assessment in ozone treated broccoli florets using during modified atmosphere packaging. *Institute of Food Technologists Annual Meeting*, book of abstracts, p99.
- [249]. Li, C.S., and Wang, Y.C., (2003), Surface germicidal effects of ozone for micro-organisms, *AIHA*, 64, 533-537.
- [250]. Li, D., Wang, M., Dinghra, K., and Hittelman, W.N. (1996), Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: clues to breast cancer etiology. *Cancer Res.* 56:287-293.
- [251]. Li, S., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A., Vitti, T. G., and Crow, G. ,(1997), Pharmacokinetics of Ochratoxin A and Its Metabolites in Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 145, 82-90.
- [252]. Li, S., Marquardt, R. R., and Frohlich, A. A. (2000), Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine of rats. *Food and Chemical Toxicology* 38, 141-152.
- [253]. Liew, C.L., and Prange, R.K., (1994), Effect of ozone and storage temperature on postharvest diseases and physiology of carrots (*Caucus carota L.*), *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 119, 563-567.
- [254]. Lillehoj, E.B., and Elling, F., (1983), Environmental conditions that facilitate Ochratoxin A contamination of agricultural commodities, *Acta Agric. Scand.*, 33, 113-128.
- [255]. Lillehoj, E. B., Kwolek, W. F., Elling, F., and Krogh, P., (1979), Tissue distribution of radioactivity from ochratoxin A-14C in rats. *Mycopathologia* 68, 175-177.
- [256]. Lintschinger, J., Fuchs, N., Moser, H., Jager, R., Hlebeina, T., markolin, G., and Gossler, W., (1997), Uptake of various trace elements during germination of wheat, buckwheat and quinoa, *plant Food Hum. Nutr.*, 50, 223-237.
- [257]. Lo Curto, R., Pellicano, T., Vilasi, F., munafo, P., and Dugo, G., (2004), Ochatoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food chemistry*, 84, 71-75

- [258]. Lopez, H.W., Adam, A., Leenhart, F., Scalbert, A., and Remezy, C., (2001), Maîtrise de la valeur nutritionnelle du pain, Ind. Céréales, 124, 15-20.
- [259]. Lopez-Garcia, R., Park, D.L., and Gutierrez de Zubiaurre, M.B., (1999), Procédés pour réduire la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires, In Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, TEC & DOC, 387-408.
- [260]. Mac Donald, S., Sharman, M., Castle, L., and Gilbert, J., (1993), Ochratoxin A in Foodstuffs and human plasma. In : Scudamore ed. Occurrence and significance of mycotoxins. Central laboratory MAFF, U.K., 208-213.
- [261]. Mac Gowan, C.L., Bethea, R.M., and Tock, R.W., (1979), Feasibility of controlling onion and garlic dehydration odors with ozone, Trans. Am. Agric. Eng., 22, 899-905.
- [262]. Mac Kenzie KS, Sarr AB, Mayura K, Bailey RH, Miller DR, Rogers TD, Norred WP, Voss KA, Plattner RD, Kubena LF, Phillips TD.,(1997), Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. Food Chemical Toxicology 35:807-820.
- [263]. Madsen, A., Mortensen, H.P., and Hald, B. (1982a), Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I: influence on pig performance and residues. Acta Agri. Scand. 32, 225-239.
- [264]. Madsen, A., Hald, B., Lillehoj, E., and Mortensen, H.P., (1982b) Feeding experiments with Ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. II. Naturally contaminated barley given for 6 weeks from 20kg compared with normal barley supplemented with crystalline ochratoxin A and/or citrinine. Acta Agric. Scand., 32, 369-372.
- [265]. MAFF, (1995), Surveillance for Ochratoxin A in retail coffee products (food surveillance information sheet N° 73), London, Joint food safety and standard group.
- [266]. Magan, N., and Aldred, D., (2005), Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities, Food Additives and Contaminants, supplement 1, 10-16.
- [267]. Majerus, P., Bresch, H., and Ottender, H., (2000), Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. Archiv. Für Lebensmittelhygiene, 51, 81-128.
- [268]. Mally A., Zepnik, H., Wanek P., Eder E., Dingley K, Ihmels H., Volkel, W., and Dekant, W. (2004), Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. Chem.Res.Toxicol. 17, 234-242.
- [269]. Mally, A., and Dekant, W., (2005), DNA adduct formation by ochratoxin A : Review of the available evidence, Food Additives and Contaminants, suppl. 1, 65-74.
- [270]. Manderville, R. A. (2005), A case for the genotoxicity of ochratoxin a by bioactivation and covalent DNA adduction. Chemical Research In Toxicology 18, 1091-1097.
- [271]. Manderville, R. A., and Pfohl-Leschkowicz, A. (2006), Genotoxicity of chlorophenols and ochratoxin A. Advances in Molecular Toxicology (sous presse),
- [272]. Mannon, J., and Johnson, E., (1985), Fungi down on the farm, New Sci., 28, 12-16.
- [273]. Mantle, P., Kulinskaya, E., and Nestler, S., (2005), Renal tumourigenesis in male rats in response to chronic dietary Ochratoxin A, Food Additives and Contaminants, 22 (supplement 1), 58-64.
- [274]. Maresca, M., Mahfoud, R., Pfohl-Leschkowicz, A., and Fantini, J., (2001), The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion, Toxicology and Applied Pharmacology, 176, 54-63.
- [275]. Markovic, B., (1985), Néphropathie des Balkans et carcinomas à cellules transitionnelles. J. Urologie, 91, 215-220.
- [276]. Meinwald, J. (1955), Chemische Berichte 88: 1889-1920
- [277]. Meisner, H., and Selanik, P. (1979), Inhibition of renal gluconeogenesis in rats by ochratoxin. The Biochemical Journal 180, 681-684.
- [278]. Meisner, H., and Chan, S. (1974), Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. Biochemistry 13, 2795-2800.
- [279]. Meisner, H., and Cimbala, M.A., (1986) Effects of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys, Dev. Toxicol. Environ., 12, 261-271..
- [280]. Meisner, H., Cimbala, M. A., and Hanson, R. W. (1983), Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly (A)+ RNA level by ochratoxin A. Archives Of Biochemistry And Biophysics 223, 264-270.
- [281]. Meki, A.R., Hussein, A.A., (2001), Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 130, 3, 305-313.
- [282]. Merck Index, 1989, 11th edition, Merck & Co Inc.
- [283]. Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Ioppolo, A., and Mantovani, A., (1987) Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry.1. Residues of Ochratoxin A in broilers and laying hens, Poultry Sci, 66, 47-50.
- [284]. Micco, C., Grossi, M., Miraglia, M., and Brera, C., (1989), A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans, Food additives and Contaminants, 6, 333-339.
- [285]. Micco, C., Ambrozzi, A., Miraglia, M., Brera, C., Onori, R., and Benelli, L., (1991), Contamination of human milk with ochratoxin A. Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract tumors, edited by P. R. Castegnaro, R. Plestina, M. Dirheimer, G., Chernozemsky and I. N. Bartsch, IARC Scientific Publications N° 115 (Lyon: IARC), 105-108.
- [286]. Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S., and Ambrozzi, A., (1995), Evaluation of Ochratoxin A in human milk in Italy, Food Additives and Contaminants, 12, 351-354.
- [287]. Miljkovic, A., Pfohl-Leschkowicz, A., Dobrota, M., Mantle, P.G., (2002), Comparative responses to mode of oral administration and dose of Ochratoxin A or nephrotoxic extract of *Penicillium polonicum* in rats, Experimental and Toxicological Pathology, 54, 305-312.

- [288]. Miller, A.D., Grow, W.R., Dees, L.A., Mitchell, M.R., Manning, T.J., (1998), A history of patented methods of ozone production from 1897 to 1997. www.valdosta.edu/~tmanning/research/ozone
- [289]. Miller, E. C., and Miller, J. A., (1981), Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 47, 2327-2345.
- [290]. Miller, J. D., (1995), Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *Journal of Stored Products Research* 31, 1-16.
- [291]. Miller, J.D., and Trenholm, H.L., (1994), *Mycotoxins in grain, compounds other than Aflatoxin*. Eagan press, st Paul, Minnesota, USA.
- [292]. Ministry of agriculture, fisheries and food, (1996), ochratoxin A in cereals and flour, and carry-over into retail processed foods (food surveillance information sheet N° 95), London, Joint food safety and standard group.
- [293]. Ministry of agriculture, fisheries and food, (2001), survey of milk for mycotoxins (food surveillance information sheet N°17/01), London, Joint food safety and standard group
- [294]. Miraglia, M., and Brera, C., (2002) Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, rapport Task force 3.2.7.
- [295]. Miraglia, M., De Dominicis, A., Brera, C., Corneli, S., Cava, E., Menghetti, E., and Miraglia, E., (1995), Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment, *Nat. Toxins*, 3, 436-444.
- [296]. Mislivec, P. B., and Tuite, J., (1970), Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels. *Mycologia*, 62, 75-88.
- [297]. Molinié, A., (2004), Qualité sanitaire des blés en région Midi-Pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines de stockage (ochratoxine A et citrinine), Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. Mémoire de thèse.
- [298]. Molinié, A., and Pfohl-Leszkowicz, A., (2002), Les mycotoxines dans les cereales : les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir des produits dérivés. Les notes ASEDIS-SO, Hors-série spécial Mycotoxines, 32-42.
- [299]. Molinié A., V. Faucet, M. Castegnaro and A. Pfohl-Leszkowicz, (2005), Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in Ochratoxin A, Citrinin and Fumonisin B1. : Development of a new method for simultaneous extraction of Ochratoxin A and Citrinin, *Food Chemistry*, 92, 391-400.
- [300]. Monnet-Tschudi, F., Sorg, O., Honegger, P., Zurich, A.C., and Schilter, B., (1997), Effects of the naturally occurring food mycotoxin ochratoxin A on brain cells in culture, *Neurotoxicology*, 18, 831-839.
- [301]. Moore, G., Griffith, C., and Peters, A., (2000), Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant, *J. Food Protect*, 63, 1100-1106.
- [302]. Mori, H., Kawai, K., Bayashi, F., Kuniyasu, T., Yamazaki, M., Hamazaki, T., and Williams, G.M., (1984), Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Res.*, 44, 2918-2923.
- [303]. Mortensen, G. K., Hald, B., and Madsen, A., (1983), Ochratoxin A contaminated barleys for sow and piglets : pig performances and residues in milk and pigs. *Acta Agri.Scand.* 33, 349-352.
- [304]. Mukanganyama S., Figueroa C.C., Hasler, J.A., Niemeyer, H.A., (2003), Effects of DIMBOA on detoxification enzymes of the aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: aphididae), *Journal of Insect Physiology* 49, 223-229
- [305]. Muller, G., Kielstein, P., Kohler, H., Berndt, A., and Rosner, H., (1995), Studies on the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model, *Mycoses*, 38, 85-91.
- [306]. Muller, G., Kielstein, P., Rosner, H., Berndt, A., Heller, M., Kohler, H., (1999), Studies of the influence of Ochratoxin A on immune and defence reactions in weaners, *Mycoses*, 42, 495-505.
- [307]. Munro, C., Moodie, A., Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., and Grice, H.C., (1974), Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of Ochratoxin A, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28, 180-188.
- [308]. Müntz, K., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Schlereth, A., and Tedemann, J., (2001), Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth, *J. Exp. Bot.*, 52, 1741-1752.
- [309]. Nagy, A., and Loufty, M., (2002), Influence of γ -radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits, *Food Control*, 281-288.
- [310]. Naitoh, S., (1992), Studies on application of ozone in food preservation : synergistic sporidicidal effects of gaseous ozone and ascorbic acid, isoascorbic acid to *Bacillus subtilis* spores. *J. Antibact. Antifung. Agents*, 20, 565-570.
- [311]. Naitoh, S., Okada, Y., and Sakai, T., (1988), Studies on utilization of ozone in food preservation : Changes in microflora of ozone-treated cereals, grains, peas, beans and spices during storage, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 35, 69-77.
- [312]. Nakagawa, E., Amano, T., Hirai, N., and Iwamura, H., (1995), Non-induced cyclic hydroxamic acids in wheat during juvenile stage of growth, *Phytochemistry*, 38, 1349-1354.
- [313]. National Toxicology Program, (1989), *Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344 Rats (Gavage Studies)* (NIH Publication No. 89-2813), Research Triangle Park, NC: US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health.
- [314]. Niemeyer, H.M., (1988), Hydroxamic acids 4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones defense chemical in Graminae, *Phytochemistry*, 27, 3349-3358.
- [315]. Nikolov, I. G., Petkova-Bocharova, D., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Gill, C., Day, N., and Chernozemsky, I. N., (1996), Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an

- area with Balkan endemic nephropathy. *Journal Of Environmental Pathology, Toxicology And Oncology: Official Organ Of The International Society For Environmental Toxicology And Cancer* 15, 201-207.
- [316]. Northolt M.D., van Egmond, H. P., and Paulsch W.E., (1979), Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *J.Food P.* 42, 485-490.
- [317]. O'Brien, E., Heussner, A.H., and Dietrich, D.R., (2001), Species-, Sex-, and Cell Type-Specific Effects of Ochratoxin A and B, *Toxicological Sciences*, 63, 256-264.
- [318]. O'Brien, E., and Dietrich, D. R. (2005), Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Reviews In Toxicology* 35, 33-60.
- [319]. Obrecht-Pflumio, S., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A., and Dirheimer, G., (1996), Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney, *Arch. Toxicol.*, 70, 277.
- [320]. Obrecht-Pflumio, S., Chassat, T., Dirheimer, G., and Marzin, D., (1999), Genotoxicity of ochratoxin A by *Salmonella* mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 446, 95-102.
- [321]. Odhav, B. and Naicker, V., (2002), Mycotoxins in South African Traditionnally brewed beers, *Food Addit. Contam.*, 18, 55-61.
- [322]. Ominski R. H., Marquardt, R. R., Sinha, R. N., and Abramson, D., (1994), Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi . In : Miller, J. D., and Trenholm, H. L. *mycotoxins in grain : compounds other than aflatoxin*, Eagan Press, pp 287-312
- [323]. Osborne, B.G., (1979), Reverse-phase high performance liquid chromatography determination of ochratoxin A in flour and bakery products, *J. Sci. Food Agric.*, 30, 1065-1070.
- [324]. Osborne, B.G., Ibe, F., Petagine, F., Scudamore, K.A., Banks, J.N., Hetmanski, M.T., and Leornard, C.T., (1996), The effects of milling and processing on wheat contaminated with Ochratoxin A, *Food Additives and contaminants*, 13, 141-153.
- [325]. Palli, D., Miraglia, M., Saieva, C., Masala, G., Cava, E., Colatosti, M., Corsi, A.M., Russo, A., and Brera, C., (1999), Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany : correlation with individual characteristics and between repeat measurements, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 8, 265-269.
- [326]. Pan, G. Y. Y., and Chen, C.L., (1984), "Studies on ozone bleaching. I. The effect of pH, temperature, buffer systems and heavy metal-ions on stability of ozone in aqueous solution." *Journal of Wood Chemistry and Technology* 4(3): 367-387.
- [327]. Pang, K.S., and Rowland, M., (1977), Hepatic clearance of drugs. I.Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 5, 625-653.
- [328]. Pang, K.S., and Gillette, J.R., (1978), Kinetics of metabolite formation and elimination in the perfused rat liver preparation: differences between the elimination of preformed acetaminophen and acetaminophen formed fromphenacetin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207, 178- 194.
- [329]. Paolini, M., Pozzetti, L., Perocco, P., Mazzullo, M., Cantelli-Forti, G., (1999), Molecular non-genetic biomarkers of effect related to methyl thiophanate cocarcinogenesis : organ- and sex-specific cytochrome P450 induction in the rat, *Cancer Letters* 135, 203-213.
- [330]. Park, D.I., (1993), Perspectives on mycotoxin decontamination procedures, *Food Additives and Contaminants*, 10, 49-60.
- [331]. Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., and Pohland, A.E., (1988), Review of decontamination of aflatoxin by amoniation : current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 685-702.
- [332]. Park, J.W., Kim, E.K., Shon, D.H., Kim, Y.B., (2002), Natural co-occurrence of Aflatoxin B1, Fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea, *Food Additives and contaminants*, 19, 1073-1080.
- [333]. Parthasarathy, V. R. and R. C. Peterson (1990), Ozone bleaching, Part I. The decomposition of ozone in aqueous solution - Influence of pH, temperature and transition metals on the rate kinetics of ozone decomposition. *Oxygen Delignification*, TAPPI.
- [334]. Patterson R, Young LG (1993), Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate, screening and dilution in reducing the effects of mold contaminated corn in pigs. *Can J Anim Sci* 73:615-624.
- [335]. Petkova-Bocharova, T., and Castegnaro, M. (1991), Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Scientific Publications* 135-137.
- [336]. Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I. N., and Castegnaro, M., (1988), Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit Contam.*5, 299-301.
- [337]. Petkova-Bocharova, T., Stoichev, I. I., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M., and Pfohl-Leszkowicz, A., (1998), Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother. *Environmental And Molecular Mutagenesis* 32, 155-162.
- [338]. Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A., Garren L., Grosso, F., Nikolov, I., Dragacci, S., and Chernozemsky, I. N., (2003a), Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants form an area with Balkan endemic nephropathy : a one month follow up study. *Facta Universitatis* 10, 57-62.
- [339]. Petkova-Bocharova, T., El Adlouni, C., Faucet V., Pfohl-Leszkowicz, A., and Mantle, P. G., (2003b), Analysis for DNA adducts, ochratoxin A content and enzyme expression in kidneys of pigs exposed to mild experimental chronic ochratoxicosis. *Facta Universitatis* 10, 111-115.
- [340]. Pfohl-Leszkowicz, A, (1999a), Définition et origine des mycotoxines, *in* : Les mycotoxins dans l'alimentation : evaluation et gestion du risqué, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 3-15.

- [341]. Pfohl-Leszkowicz, A., (1999b), Ecotoxicogénèse, in : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, Ed. TEC et DOC, Lavoisier, Paris, 17-35.
- [342]. Pfohl-Leszkowicz, A., (1999c), Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Les mycotoxines dans l'alimentation, ed TEC&DOC, pp 478.
- [343]. Pfohl-Leszkowicz, A., and Castegnaro, M., (1999), L'ochratoxine A. in : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, eds Technique et Documentation, chapitre 9, 249-277.
- [344]. Pfohl-Leszkowicz, A & Castegnaro, M., (2002), Rôles des mycotoxines dans le développement de certains cancers. Dans Toxines et recherches biomédicales, collection SFET, Goudey-Perrière, F., Bon Cassian, Puiseux-Dao, S. & Sauviat M-P (eds) Elsevier, pp 143-152.
- [345]. Pfohl-Leszkowicz, A., and Castegnaro, M., (2005), Further arguments in favour of direct covalent binding of Ochratoxin A (OTA) after metabolic biotransformation. Food Additives and contaminants, 22, 75-87.
- [346]. Pfohl-Leszkowicz, A & Castegnaro M., (2006), Answer to letter to editor from Dekant on analysis of breakfast cereal. Food Chemistry, 99 178-181.
- [347]. Pfohl-Leszkowicz, A., Chakor, K., Creppy, E. E., and Dirheimer, G. (1991), DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. IARC Scientific Publications, 245-253.
- [348]. Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Kane, A., Creppy, E. E., and Dirheimer, G., (1993), 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 289, 265-273.
- [349]. Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Castegnaro, M., Nicolov, I. G., Chernozemsky, I. N., Bartsch, H., Betheder, A. M., Creppy, E. E., and Dirheimer, G., (1993c), Ochratoxin A-related DNA adducts in urinary tract tumours of Bulgarian subjects. IARC Scientific Publications 141-148.
- [350]. Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Kane, A., Gharbi, A., Baudrimont, I., Obrecht, S., Creppy, E.E., and Dirheimer, G., (1993d), Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of OTA? In : Libbey, J., editor. Human ochratoxicosis and related pathologies, 231, Colloque INSERM, 177-187.
- [351]. Pfohl-Leszkowicz, A., Obrecht-Pflumio, S., Grosse, Y., and Dirheimer, G., (1994), Involvement of antioxidants and inhibitors of glutathione conjugation in OTA genotoxicity in mice liver and kidney, Toxicology Letters, 74, 64-69.
- [352]. Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Carrière, V., Cugnenc, P.H., Berger, A., Carnot, F., Beaune, P.H., and de Waziers, I., (1995), High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer. Cancer Res. 55:56115616.
- [353]. Pfohl-Leszkowicz, A., Pinelli, E., Bartsch, H., Mohr, U., and Castegnaro, M., (1998), Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. Molecular Carcinogenesis 23, 76-85.
- [354]. Pfohl-Leszkowicz, A., Guerre, P., and Galtier, P., (1999), Métabolisation des mycotoxines In/ Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, Ed TEC & DOC.
- [355]. Pfohl-Leszkowicz, A, Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N & Castegnaro, M., (2002a), Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins, Food Additive and Contaminants 19 (3), 282-302.
- [356]. Pfohl-Leszkowicz, A., Bartsch, H., Azemar, B., Mohr, U., Estève J., and Castegnaro, M., (2002b), MESNA protects rats against nephrotoxicity but not carcinogenicity induced by ochratoxin A, implicating two separate pathways. Facta Universitatis 9, 57-63.
- [357]. Pfohl-Leszkowicz, A, Molinié A., & Castegnaro, M., (2004), Presence of ochratoxin a, citrinin and fumonisin b₁ in breakfast cereals collected in french market. Comparison of OTA analysis using or not immunoaffinity clean-up before HPLC. The revista Mexicana de Micología, 19, 7-15.
- [358]. Pfohl-Leszkowicz A., Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Garren L., Grosso F., Nikolov I., Dragacci S., Chernozemsky, I.N., Castegnaro M., (2006), Analysis of ochratoxin a in serum, urine and food consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a one month follow up study Proceeding IUPAC meeting, Washington, May 2004 (sous presse).
- [359]. Phillips, D. H., and Castegnaro, M. (1999), Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. Mutagenesis 14, 301-315.
- [360]. Pinelli, E., El Adlouni, C., Pipy, B., Quartulli, F., and Pfohl-Leszkowicz, A., (1999), Roles of cyclooxygenase and lipoxygenases in ochratoxin A genotoxicity in human epithelial lung cells. Environmental Toxicology and Pharmacology 7, 95-107.
- [361]. Pitout, M. J., (1969), The hydrolysis of ochratoxin a by some proteolytic enzymes. Biochemical Pharmacology 18, 485-491.
- [362]. Pitt, J. I., (1987), *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. Applied And Environmental Microbiology 53, 266-269.
- [363]. Pitt, J.J., and Hocking, A.D., (1997) Fungi and food spoilage, 2nd Edition, Gaithersburg, MD : Aspen Publishers.
- [364]. Plank, G., Bauer, J., Grunkemeier, A., Fischer, S., Gedek, B., Berner, H., (1990), The protective effect of adsorbents against ochratoxin A in swine, Tierärztliche Praxis, 18, issue 5, 483-489.
- [365]. Pohland, A. E., Nesheim S., and Friedman, L., (1992), Ochratoxin A: a review. Pure and Applied Chemistry, 64, 1029-1046.
- [366]. Poirier, M.C., and Beland, F.A., (1992), DNA adducts measurements and tumour incidence during chronic carcinogenic exposure on animal models: implication for DNA adduct-based human cancer risk assessment, Chemical research and Toxicology, 5, 749-755.

- [367]. Price, T.V., (1988), Seed sprouts production for human consumption. A review. *Can. Int. Food Sci. Tech.* J., 21, 57-65.
- [368]. Prior, M.G., O'Neil, J.B., and sisodia, C.S., (1980), effects of ochratoxin A on growth response and residues in broilers, *Poultry Sciences*, 59, 1254-1257.
- [369]. Purchase, I. F., and Van der Watt, J. J., (1971), The long-term toxicity of Ochratoxin A to rats. *Food and Cosmetics Toxicology* 9, 681-682.
- [370]. Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M., and Lucic, A., (1997), Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicology Letters* 91, 105-109.
- [371]. Rahimtula, A. D., Bereziat, J.-C., Bussacchini-Griot, V., and Bartsch, H., (1988), Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochemical Pharmacology* 37, 4469-4477.
- [372]. Raistrick, H., Smith, G., (1941), Antibacterial substances from moulds. Citrinin, a metablocic product of *Penicillium citrinum*. *Chem. Ind.*, 828-836.
- [373]. Ramirez, G.A., Yezak, C.R., Jeffrey, J.S., Rogers, T.D., Hithchens, G.D., and Hargis, B.M., (1994), Potential efficacy of ozonation as a Salmonella decontamination method in broiler carcasses. *Poultry Sciences*, Abstr. P21.
- [374]. Randerath, K., Reddy, M. V., and Gupta, R. C., (1981), 32P-labeling test for DNA damage. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 78, 6126-6129.
- [375]. Rapport de la commission Européenne, Direction Générale de la Santé et de la Protection des Consommateurs, (2003), contrôle des résidus de pesticides dans les produits d'origine végétale dans l'Union Européenne, en Norvège, en Islande et au Liechtenstein.
- [376]. Razumovskii, S.D., and Zaikov, G.E., (1984), *Studies in organic chemistry : ozone and its reactions with organic compounds*, vol. 15, Elsevier, New York.
- [377]. Reagan, J.O., Acuff, G.R., Buege, D.R., Buyck, M.J., Dickson, J.S., Kastner, C.L., Marsden, J.L., Morgan, J.B., Nickelson, R., Smith, G.C., and sofos, J.N., (1996), Trimming and washing of beef carcasses as a method of improving the microbiological quality of meat, *Journal of Food Protection*, 59, 751-756.
- [378]. Reddy, M. V., and Randerath, K., (1986), Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7, 1543-1551.
- [379]. Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F., and Hassan, A.A., (1996), Detection of Ochratoxin Produced by A. Ochraceus in Feedstuffs and its Control by γ Radiation, *Appl. Radiat. Isot.*, 47, 61è-621.
- [380]. Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., and Palnikar, P., (1995), Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms, *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3471-3475.
- [381]. Ribelin, W. E., Fukushima, K., and Still, P. E., (1978), The toxicity of ochratoxin to ruminants. *Canadian Journal Of Comparative Medicine. Revue Canadienne De Medecine Comparee* 42, 127-126.
- [382]. Rice, R.G., Farquhar, J.W., and Bollyky, L.J., (1982), Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods, *Ozone Sci. Eng.*, 4, 147-163.
- [383]. Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J., and Larondelle, Y., (2006), Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update, *Chemico-Biological Interactions*, 159, 18-46.
- [384]. Rinn, J.L., Rozowsky, J.S., Laurenzi, I.J., Petersen, P.H., Zou, K., Zhong, W., Gerstein, M., and Snyder, M., (2004), Major molecular differences between mammalian sexes are involved in drug metabolism and renal function, 6, 791-800.
- [385]. Ropkins, K., and Beck, A.J., (2003), Using HACCP to control organic chemical hazards in food wholesale, distribution, storage and retail, *Trends in Food Science & Technology* 14, 374-389.
- [386]. Roth, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Kane, A., Röschenthaler, R., and dirheimer, G., (1988), Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice, *Toxicology*, 48, 293-308.
- [387]. Rotter RG, Marquardt RR, Frohlich AA, Abramson D, (1990), Ensiling as a means of reducing ochratoxin A concentrations in contaminated barley. *J Sci Food Agric*, 50:155-166.
- [388]. Ruhland M, Engelhardt G, Wallnoefer PR, Schaefer W (1994), Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in wheat and maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften*, 81:453-454.
- [389]. Ruhland M, Engelhardt G, Schafer W, Wallnoefer PR, (1996a), Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. *Nat Toxins*, 4:254-260.
- [390]. Ruhland M, Engelhardt G, Wallnoefer PR, (1996b), Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants. 2. Time course and rates of degradation and metabolite production in cell-suspension cultures of different crop plants. *Mycopathologia*, 134:97-102.
- [391]. Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., Torok-Storb, B., (1994), HK-2 : an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult kidney, *Kidney Int.*, 45, 48-57.
- [392]. Sansing, G.A., Lillehoj, T.M.S., Detroy, R.W., and Miller, M.A., (1976), Synergistic toxic effects of citrinine, ochratoxin A and penicillic acid in mice, *Toxicon.*, 14, 213-220.
- [393]. Sarig, P., Zahavi, T., Zutkhi, Y., Yannai, S., Lisker, N., and Ben-Arie, R., (1996), Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 48, 403-415.
- [394]. Scarpino, P.V., Berg, G., Chang, S.L., Dahling, D., and Lucas, M., (1972), A comparative study of inactivation of viruses in water by chlorine, *Water Research*, 6, 959-965.
- [395]. Schatzmayr, G., Zehner, F., Schatzmayr, D., Täubel, M., and Binder, E.M., (2005), Microbiologicals for deactivating mycotoxins in contaminated feed, Communication orale, Symposium Euro-Magrebien sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fez, Maroc.

- [396]. Schlatter, C., Studer-Rohr, J., and Rasonyl, T., (1996), Carcinogenicity and kinetic aspects of Ochratoxin A. Food Additives and contaminants, 13, 43-44.
- [397]. Schramek, H., Wilflingseder, D., Pollack, V., Freudinger, R., Mildenerberger, S., and Gekle, M., (1997), Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases $\frac{1}{2}$ is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. J. Pharmacol. Exp. Ther., 283, 1460-1468.
- [398]. Schubert, C. C. and R. N. Pease, (1956), The oxidation of Lower Paraffin Hydrocarbons. II. Observations on the Role of Ozone in the Slow Combustion of Isobutane. Journal of the American Chemical Society, 78: 5553-5556.
- [399]. Schwerdt, G., Bauer, K., Gekle, M., and Silbernagl, S., (1996), Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro. Toxicology 114, 177-185.
- [400]. Schwerdt, G., Freudinger, R., Sibernagl, S., Gekle, M., (1998), Apical uptake of radiolabelled ochratoxin A into Madin-Darby canine kidney cells, Toxicology, 131, 193-202.
- [401]. Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerberger, S., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1999a), The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. Cell Biology And Toxicology, 15, 405-415.
- [402]. Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S., and Gekle, M., (1999b), Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. Toxicology, 135, 1-10.
- [403]. Scott, P.M., and Kanhere, S.R., (1995), Determination of ochratoxin A in beer, Food Additives and contaminants, 12, 591-598.
- [404]. Scudamore, K.A., (2005), Prevention of Ochratoxin A in commodities and likely effects of processing fractionation and animal feeds, Food Additives and contaminants, supplement 1, 17-25.
- [405]. Scudamore, K.A., & Livesey, C., (1998), occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage : a review., J. Sci. Food Agri., 77, 1-17.
- [406]. Scudamore, K., A., Banks, J., and Mc Donald, S.J., (2003), Fate of Ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production, Food Additives and Contaminants, 20, 1153-1163.
- [407]. Scudamore KA, Banks JN, Guy RCE., (2004), Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. Food Additives and Contaminants, 21:488-497.
- [408]. Sergent, T., Garsou, S., Schaut, A., de Saeger, S., Pussemier, L., Van Peteghem, C., Larondelle, Y., and Schneider, Y.J., (2005), Differential modulation of ochratoxin A absorption across Caco-2 cells by dietary polyphenols, used at realistic intestinal concentrations, Toxicology Letters, 159, 60-70.
- [409]. Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., venancio, A., Lima, N., (2003), Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room, Journal of Food Protection, 66, 2355-2358.
- [410]. Shetty, P.H., and Jespersen, L., (2005), *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents, Trends in Food Science & Technology, 1-8.
- [411]. Shiler, G.G., Eliseeva, N.N., and Chebotarev, L.N., (1978), Use of ozone and ultra-violet radiation for the inactivation of mould spores. 20th International Dairy Congress, E, 616.
- [412]. Shitara, Y., Sato, H., Sugiyama, Y., (2005), Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 689-723.
- [413]. Sicker, D., Frey, M., Schultz, M., and Gierl, (2003), Role of natural benzoxazinones in the survival strategy of plants, International Review of Cytology, 198, 319-346.
- [414]. Simarro Doorten, A. Y., Bull, S., van der Doelen, M. A. M., and Fink-Gremmels, J., (2004), Metabolism-mediated cytotoxicity of ochratoxin A. Toxicology in Vitro 18, 271-277.
- [415]. Simarro Doorten, Y., Nijmeijers, S., de Nijs-Tjon, L., and Fink-Gremmels, J., (2006), Metabolism-mediated Ochratoxin A genotoxicity in the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay, Food Chem. Toxicol., 44, 261-270.
- [416]. Singh, G.S., Chauhan, H.V., Jha, G.J., and Singh, K.K., (1990), Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks, J. Comp. Pathol., 103, 399-410.
- [417]. Sire, B., Sanglier, J.J., and Davis, L., (1989), Biosynthèse des antibiotiques, Eds Masson, Paris.
- [418]. Skaugh, M.A., Stormer, F.C., and Saudstad, O.D., (1998), Ochratoxin A : a naturally occurring mycotoxins found in human milk samples from Norway, Acta Paediatr., 87, 1275-1278.
- [419]. Skrinjar, M., Rasic, J.L., Stojicic, V., (1996), Lowering ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and bifidobacteria. Folia Microbiol. 41, 26-28.
- [420]. Slikker W., Andersen, M.E., Bogdanffy, M.S., Bus, J.S., Cohen, S.D., Conolly, R.B., David, R.M., Doerrler, N.G., Dorman, D.C., Gaylor, D.W., Hattis, D., Rogers, J.M., Setzer, R.W., (2004), Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity, Toxicology and Applied Pharmacology, 201, 203- 225.
- [421]. Sokol, P. P., Ripich, G., Holohan, P. D., and Ross, C. R., (1988), Mechanism of ochratoxin A transport in kidney. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics 246, 460-465.
- [422]. Speijers, GJA & Speijers MHM, (2004), Combined toxic effects of mycotoxins, Toxicology Letters 153, 91-98
- [423]. Staehelin, J., and Hoigne, J., (1985), Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reaction, Environmental Sciences and Technology, 19, 1206-1213.
- [424]. Stander, M.A., Bornscheuer, T., Henke, E., Steyn, P.S., (2000), Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. J. Agric. Food Chem. 48, 5736-5739.
- [425]. Stander, M.A., Steyn, P.S., van der Westhuizen, F.H., Payne, B.E., (2001), A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. Chemical research and Toxicology 14, 302- 304.

- [426]. Stein, A.F., Phillips, T.D., Kubena, L.F. & Harvey, R.B., (1985), Renal tubular secretion and reabsorption as factors in ochratoxicosis: Effects of probenecid on nephrotoxicity. *Journal of Toxicology and Environment Health*, 16, 593–605.
- [427]. Steyn, P., (1984), Ochratoxins and related dihydrocoumarins in : Betina ed. *Mycotoxins-production, isolation, separation and purification*. Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 183-216.
- [428]. Steyn, P. S., (1995), Mycotoxins, general view, chemistry and structure, *Toxicology Letters*, 82/83, 843-851.
- [429]. Stockinger, H.E., (1962), Effects on air pollution on animals, 282-284. In A. C. Stern (Ed.) *air Pollution*, vol 1. Academic Press, New York.
- [430]. Stoev, S.D., Kunev, I., and Radic, B., (1997), Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneous cases of mycotoxic nephropathy (ochratoxicosis) in pigs. *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, 3, 507-516.
- [431]. Stoev, S.D., Stoeva, J.K., Anguelov, G., Hald, B., creppy, E.E., and radic, B. (1998) Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneous cases with different frequency of porcine nephropathy in Bulgaria. *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, 45, 229.
- [432]. Stoev, S.D., Djuvinov, D., Mirtcheva, T., Pavlov, D., Mantle, P., (2002), Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A in chicks, *Toxicology Letters* 135, 33-50.
- [433]. Stojkovic, R., Hult, K., Gamulin, S., and Plestina, R., (1984), High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochemistry International* 9, 33-38.
- [434]. Størm, O., Holm, H., and Stormer, F. C., (1982), Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied And Environmental Microbiology* 44, 785-789.
- [435]. Størm, F. C., (1992), Ochratoxin A: a mycotoxin of concern. In *Handbook of Applied Mycology*. Bhatnagar D., Lillehoj E.B., Arora D.K.eds, Dekker, N.Y. 403-432.
- [436]. Størm, F. C., Hansen, C. E., Pedersen, J. I., Hvistendahl, G., and Aasen, A. J., (1981), Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Applied And Environmental Microbiology* 42, 1051-1056.
- [437]. Stormer, F. C., Størm, O., Hansen, C. E., Pedersen, J. I., and Aasen, A. J., (1983), Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from Ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Applied And Environmental Microbiology* 45, 1183-1187.
- [438]. Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., and Schlatter, C., (1995), The occurrence of Ochratoxin A in coffee, *Fd. Chem. Toxic.*, 33, 341-355.
- [439]. Studer-Rohr, I., Schlatter, J., and Dietrich, D. R., (2000), Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives Of Toxicology* 74, 499-510.
- [440]. Suarez Quiroz, M.L., (2004), Etude des conditions de production d'ochratoxine A dans le café. Contrôle et prévention de sa formation, thèse de l'université de Montpellier II.
- [441]. Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., guyot, B., Schorr-galindo, S., and Guiraud, J.P., (2004), Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee, *food microbiology*, 21, 629-634.
- [442]. Sujbert, L., Racz, G., Szende, B., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., and Török, G., (2006), Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfections : survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames test, *Toxiology*, 219, 106-112.
- [443]. Surget, A., and Barron, C., (2005), Histologie du grain de blé, *Industrie des céréales n°145*, 4-7.
- [444]. Suzuki, S., Satoh, T., and Yamakazi, M., (1977), The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats, *Japanese Journal of Pharmacology*. 27, 735–744.
- [445]. Terada, T., and Inui, K., (2004), Peptide transporters: structure, function, regulation and application for drug delivery. *Curr. Drug Metab.* 5, 85–94.
- [446]. Thorp, E.D., (1950), The toxicity of ozone : a report and bibliography, *Ind. Med. Surg.*, 15, 49-57.
- [447]. Thuvander, A., Breitholtz-Emmanuelson, A., Brbencova, D., and Gadhasson, I., (1996), Prenatal exposure of Balbc/C mice to ochratoxin A : effects on the immune system in the off-spring, *Food Chemistry and Toxicology*, 34, 547-554.
- [448]. Timonin, M. I., and Rouatt, J. W., (1944), Production of citrinin by *Aspergillus* species of the candidus group, *Can. J. Pub. Health*, 35, 80-88.
- [449]. Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., and Tjamos, E.C., (2004), *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece : population composition, ochratoxin A production and chemical control, *J. Phytopathology*, 152, 250-255.
- [450]. Tomiyasu, H., and Fukutomi, H., (1985), "Kinetics and Mechanism of Ozone decomposition in Basic Aqueous Solution." *Inorganic Chemistry* 24: 2962-2966.
- [451]. Trenk, H.L., Butz, M.E., and Chu, F.S., (1991), Production of ochratoxin in different cereal products by *Aspergillus ochraceus*, *Appl. Microbiol.*, 21, 1032-1035.
- [452]. Trivedi, A. B., Hirota, M., Doi, E., Kitabatake, N., (1993), Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water, *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 18, 2167-2171
- [453]. Tsuji, A., and Tamai, I., (1996), Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.* 13, 963–977.
- [454]. Turesky, R. J., (2005), Perspective: ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chemical Research In Toxicology* 18, 1082-1090.

- [455]. Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., and Fourie, L., (1965a), Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. Journal Of The Chemical Society. Perkin Transactions 1 7083-7088.
- [456]. Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., and Theron, J. J., (1965b), Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature 205, 1112-1113.
- [457]. Varga, J., and Kozakiewicz, Z., (2006), ochratoxin A in grapes and grape-derived products, Trends in Food Sciences and Technology, 17, 72-81.
- [458]. Varga, J., Rigo, K., Teren, J., (2000), Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. Int. J. Food Microbiol. 59, 1 – 7.
- [459]. Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J., and Vagvolgyi, C., (2005), Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. Int. J. Food Microbiol., 99, 321-328.
- [460]. Verger, P., Volatier, J. L., and Dufour A., (1999), Estimation des niveaux théoriques d'ingestion d'aflatoxines et d'ochratoxine. Dans: Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. TEC&DOC, Lavoisier.
- [461]. Verger, Ph., Counil, E., Tressou, J., and Leblanc, J.C., (2005), Some recent advances in modelling dietary exposure to ochratoxin A, Food Additives and Contaminants, supplement 1, 94-98.
- [462]. Verma R.J., and Shalini M. (1998), Hyperglycemia induced in rabbits exposed to ochratoxin. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60, 626-631.
- [463]. Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., and Martbauer, E., (2000), Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan Endemic Nephropathy, J. Agric. Food Chem., 48, 2483-2488
- [464]. Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Grosso, F., Nikolov, I., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M., and Dragacci, S., (2004), Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study. Journal Of Agricultural And Food Chemistry 52, 2404-2410.
- [465]. Wachter, V.J., Salphati, L., Benet, L.Z., (2001), Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. Adv. Drug Deliv. Rev. 46, 89–102.
- [466]. Wade, W.N., Scouten, A.J., McWatters, K.H., Wick, R.L., Demirci, A., Fett, W.F., and Beuchat, L.R., (2003), Efficacy of ozone in killing *Listeria monocytogenes* on alfalfa seeds and sprouts and effects on sensory quality of sprouts, Journal of Food Protection, 66, 44-51.
- [467]. Wegst, W., Lingens, F., (1983), Bacterial degradation of ochratoxin A. FEMS Microbiol. Lett. 17, 341–344.
- [468]. Wei, X., and Sulik, K.K., (1993), Pathogenesis of craniofacial and body wall malformation induced by ochratoxin A, Am. J. Med. Genetics, 47, 862-871.
- [469]. Westlake, K., Mackie, R.I., Dutton, M.F., (1987), Effects of several mycotoxins on specific growth rate of *Butyrivibrio fibrisolvens* and toxin degradation in vitro. Applied Environmental Microbiology. 53, 613– 614.
- [470]. Whistler, P.E., and Sheldon, B.W., (1989), Bactericidal activity, eggshell conductance, and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. Poult. Sci., 8, 1074-1077.
- [471]. Wilkes, M.A., Marshall, D.R., and Copeland, L., (1999), Hydroxamic acids in cereal roots inhibit growth of take-all, Soil Biology and Biochemistry, 31, 1831-1836.
- [472]. Woerner, R., Mueller, W., and Strauch, D., (1970), Investigations into the application of ozone for disinfection of slaughter-house effluent and other protein-rich media, Schlacht Viehhof Zeitung, 70, 127-132.
- [473]. Wood, G.M., (1982), Effects of processing in maize. Chem. Ind., 972-975.
- [474]. Wright, S.H., Dantzer, W.H., (2004), Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. Physiol. Rev. 84, 987–1049.
- [475]. Wu, M.T., and Ayres, J.C., (1979), Effects of dichlorvos on ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus*, J. Agric. Food Chem., 22, 536-541.
- [476]. Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., and Kemppainen, W., (1996), Toxicity of OTA, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships, Toxicol. Appl. Pharmacol. 137, 182– 192.
- [477]. Yamazaki, M., Suzuki, H., Sugiyama, Y., (1996), Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. Pharm. Res. 13, 497–513.
- [478]. Yang, F., Basu, T.K., and Oraikul, B., (2001), Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain, international Journal of food sciences and nutrition, 52, 319-330.
- [479]. Yang, P.P.W., and Chen, T.C., (1979), Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase, J. Food Sci., 44, 501-504.
- [480]. Young, J. C., (1986), Reduction in Levels of Deoxynivalenol in Contaminated Corn by Chemical and Physical Treatment. J. Agric. Food Chem., 34, 465-467.
- [481]. Zagon, J., Dehne, L.I., Wirz, J., Linke, B., and Boegl, K.W., (1992), Ozone treatment for removal of microorganisms from spices as an alternative to ethylene oxide fumigation or irradiation? Results of a practical study. Bundesgesundheitsblatt, 35, 20-23.
- [482]. Zepnik, H., Pahler, A., Schauer, U., and Dekant, W., (2001), Ochratoxin A-Induced Tumor Formation: Is There a Role of Reactive Ochratoxin A Metabolites? Toxicological Sciences 59, 59-67.
- [483]. Zepnik, H., Volkel, W., and Dekant, W., (2003), Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. Toxicology and Applied Pharmacology 192, 36-44.
- [484]. Zhang H, and Li J. (1994), Detoxification of moniliformin. Acta Microbiologica Sinica 34:119-123.

- [485]. Zhang, Y., and Benet, L.Z., (2001), The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin. Pharmacokinet.* 40, 159– 168.
- [486]. Zhou, Y., Lin, S., Chang, H.H., Dong, Z., Dorrance, A.M., Brands, M.W., and Wang, M.H., (2005), Gender differences of renal CYP-derived eicosanoid synthesis in rats fed a high-fat diet, *The American Journal of Hypertension*, 18, 530-537.
- [487]. Zimmerli, B., and Dick, R., (1995), Determination of ochratoxin A at the ppt level in human food, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup methodology and swiss data, *journal of chromatography B*, 666, 85-89.
- [488]. Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., and Miraglia, M., (2006), Natural occurrence of mycotoxins in cereals and species commercialised in Morocco, *Food Control*, in press.