

Université de Montréal

**Protection contre la toxicité due aux mycotoxines (ochratoxine A) par les
agents liant les acides biliaires**

Par

Abdelhamid Kerkadi

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en Nutrition

Avril, 1999

©Abdelhamid Kerkadi



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

**Protection contre la toxicité due aux mycotoxines (ochratoxine A)
par les agents liant les acides biliaires**

Présenté par:
Abdelhamid Kerkadi

a été évaluée par un jury composé de personnes suivantes

<i>U. Gavrić</i>	Président de jury
<i>B. Thueweber</i>	Directrice de recherche
<i>S. Chakrabarti</i>	Membre de jury
<i>B. Trotter</i>	Examineur externe
<i>H. Plaa</i>	Représentant du Doyen

Thèse acceptée le:

SOMMAIRE

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par des champignons du genre *Aspergillus* et *Penicillium*. Elle contamine toutes une variété d'aliments destinés à l'homme ou destinés aux animaux d'élevage. Outre ses effets tératogènes, carcinogènes, mutagènes et immunosuppresseurs, elle est néphrotoxique. De plus, elle est impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans et les tumeurs du tractus urinaire qui y sont associés. La contamination des aliments par l'OTA pose des problèmes importants à différents secteurs d'activité: l'agriculture, les industries agro-alimentaires et le commerce international. Par ce fait, la lutte contre la contamination par l'OTA est une priorité pour les instances nationales et internationales. Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont été faites dans le but de protéger l'animal et l'homme de l'exposition à l'OTA.

Dans ce travail, nous avons testé l'efficacité de la cholestyramine (CHA), une résine liant les acides biliaires (AB) à prévenir la toxicité induite par l'OTA. Nous avons soumis des rats pendant deux semaines à des diètes contaminées par 1 et 3 ppm d'OTA. Les diètes ont été supplémentées avec diverses concentrations de CHA (0.1; 1 ; 2.5; 3.5 et 5%) afin de déterminer la dose minimale efficace. Les résultats démontrent que l'addition de la CHA à la diète permet de diminuer significativement la concentration de l'OTA dans le plasma. Les doses de CHA minimales efficaces sont de 0.1% et 2.5% pour les diètes contenant 1 et 3 ppm respectivement. La diminution de l'OTA dans le plasma est associée à une baisse de son excrétion dans l'urine et dans la bile et par une augmentation de son excrétion fécale. LA CHA a aussi exercé un effet protecteur contre la néphrotoxicité de l'OTA telle qu'évaluée par les enzymes urinaires (γ GT et NAG) ainsi que par l'étude histologique du rein.

La CHA protégerait contre la toxicité de l'OTA par deux mécanismes possibles: une liaison directe dans l'intestin et /ou par un mécanisme indirect via le "pool" des AB.

Les résultats des études *in vitro* sur la liaison de l'OTA par la résine montrent que la CHA possède une grande affinité pour l'OTA. On a aussi montré que la résine lie le taurodéoxycholate (TDC: AB secondaire hydrophobe) ainsi que le taurocholate (TCA: AB primaire hydrophile). Mais, la capacité à lier les AB est plus élevée que celle à lier l'OTA (3.67 mmole/ g résine pour le TCA, 3.71 mmole/ g résine pour le TDC versus 2.85 mmole/ g résine pour l'OTA). Dans le but de caractériser la nature de la liaison de l'OTA avec la résine, nous avons additionné le NaCl (0 à 200 mM) à une concentration fixe de la toxine ou des AB. La sorption du taurocholate est diminuée par l'addition de NaCl (< 50 mM), indiquant une liaison électrostatique. Cependant, une diminution de la liaison de l'OTA et du taurodéoxycholate par la résine n'a été observée qu'à de fortes concentrations de NaCl (> 150 mM), montrant ainsi une forte liaison. La liaison de l'OTA avec la CHA semble être de type électrostatique (entre les charges négatives de la toxine et les groupements ammonium quaternaire de la résine), renforcée par une liaison hydrophobe. Les études de compétition entre l'OTA et le taurocholate sur les sites de liaison montrent une meilleure affinité pour l'OTA.

Les résultats du rôle des AB dans l'absorption de l'OTA démontrent que la concentration de l'OTA plasmatique est significativement diminuée dans le groupe de fistule biliaire comparé au groupe contrôle. Il est à noter que la supplémentation de la diète par l'acide cholique n'a pas entraîné de changement important dans l'absorption de l'OTA.

Cette étude a montré que la diminution de la concentration de l'OTA dans le plasma chez les rats ayant reçu de la CHA peut être expliquée, d'une part par une liaison directe de la toxine avec la résine ce qui résulte dans une diminution de son absorption intestinale et une augmentation de son excrétion fécale. Le pool des AB et la circulation entérohépatique de la toxine peuvent constituer un mécanisme additionnel pour prévenir la toxicité de l'OTA.

En conclusion, nos études ont clairement permis de montrer l'efficacité de la CHA à protéger contre la toxicité de l'OTA et de caractériser le mécanisme impliqué dans cette protection. Il serait sans doute de grand intérêt d'établir si l'effet protecteur de la CHA pourrait être étendu à d'autres mycotoxines (l'aflatoxine, la zéaralénone, les trichothécènes).

DÉDICACES

A ma femme Souhila

A mes filles Farrah-Lilia, Ilhem et Houda

A ma mère et à mon père

A mes beaux parents

A mes frères et à mes soeurs

A mes beaux frères et à ma belle soeur

A mes cousins Abdelrezak et Nabil martyrs de la violence et de la haine

A mes amis Rachid, Ouahid et Kamel

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à ma directrice de recherche Dr Beatriz Tuchweber, pour le support exceptionnel qu'elle m'a fourni depuis le début de ce travail. C'est avec rigueur et disponibilité qu'elle a assumé la direction de cette thèse. J'ai hautement bénéficié de son expérience, de son sens critique et de sa compétence scientifique.

Mes remerciements vont aussi au Dr Ronald. R. Marquardt et au Dr Andrzej. A. Frohlich du Département de Zootechnie de l'Université de Manitoba pour les analyses de l'ochratoxine A et ses métabolites.

Je remercie chaleureusement Mr. Maurice Audet pour sa grande disponibilité, ses conseils et son assistance technique.

J'adresse mes remerciements aux professeurs du Département de Nutrition, ainsi qu'au personnel du secrétariat pour avoir collaboré de près ou de loin au déroulement de mes études. Un merci tout particulier à Mme Raymonde Lebreton et à Mme Hélène Brunet pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je tiens à remercier mes camarades de laboratoire: Stéphanie Chevalier, Marie-Josée Leblanc ainsi que Claude Barriault.

Je présente mes vifs remerciements à ma femme Souhila et à mes filles Farrah-Lilia, Ilhem et Houda pour leur soutien moral ainsi que pour leur compréhension.

La réalisation de ce projet a été possible grâce à une subvention du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG). Je remercie aussi la Faculté des Études Supérieures et le Département de Nutrition pour avoir financé une partie de mes études doctorales.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
SOMMAIRE	iii
DÉDICACES	Vi
REMERCIEMENTS	Vii
TABLE DES MATIÈRES	Viii
LISTE DES FIGURES	Xiii
LISTE DES TABLEAUX	Xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	Xviii
CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE	
I.Généralités sur l'ochratoxine	1
I.1 L'ochratoxine A (OTA)	1
I.1.1 Source	1
I.1.1.1 Facteurs affectant la production d'OTA	2
a- Température et humidité	3
b- Substrat	3
I.1.2 Structure chimique	4
I.1.3 Contamination des aliments par l'OTA	6
I.1.3.1 Origine végétale	6
I.1.3.2 Origine animale	8
I.2 Pharmacocinétique	11
I.2.1 Absorption, distribution et transport	11
I.2.2 Métabolisme de l'OTA	14
I.2.2.1 Hydrolyse	14
I.2.2.2 Hydroxylation	15
I.2.2.3 Circulation entérohépatique	17
I.2.3 Excrétion	18

I.3 Etude de la toxicité induite par l'OTA chez les animaux	19
I.3.1 Toxicité aiguë	19
I.3.2 Toxicité subchronique et chronique	20
I.3.2.1 Néphrotoxicité	20
I.3.2.2 Cancérogénicité	22
I.3.2.3 Immunotoxicité	23
I.3.2.4 Tératogénicité	24
I.3.2.5 Génotoxicité et mutagénicité	25
I.4 Toxicité de l'OTA chez l'humain	27
I.4.1 Néphropathie Endémique des Balkans (BEN)	27
I.5 Mécanismes biochimiques de l'ochratoxicose	32
I.5.1 Inhibition de la synthèse des protéines	32
I.5.2 Peroxydation des lipides	33
I.5.3 Implication de la conjugaison au glutathion	34
I.5.4 Effet sur la respiration cellulaire	35
I.6 Stabilité de l'OTA au cours des transformations technologiques des aliments	35
II. Evaluation du risque pour la santé	36
II.1 Evaluation du danger	36
II.2 Evaluation de l'exposition	38
II.3 Législation et réglementation	39
III. Conclusion	40

IV. Moyens de prévention de la toxicité induite par l'OTA	41
IV.1 Moyens physiques	41
IV.2 Moyens chimiques	42
V. Prévention de l'ochratoxicose A par la cholestyramine, une résine liant les acides biliaires.	47
V.1 Structure chimique de la cholestyramine.	47
V.2 Utilisation clinique de la cholestyramine.	48
VI. Objectif général de l'étude	50
II. Hypothèse de recherche	50
VIII. Objectifs spécifiques	50
VIII.1 Étude in vitro	50
VIII.2 Étude in vivo	50
CHAPITRE 2: ARTICLE I	
Avant-propos	52
Abstract	54
Introduction	55
Material and methods	57
Results	61
Discussion	66
References	70

CHAPITRE 3: ARTICLE II

Avant-propos	87
Abstract	89
Introduction	90
Material and methods	9 2
Results	95
Discussion	98
References	101

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE 112

4.1 Effet de l'addition de la CHA sur la néphrotoxicité induite par l'OTA chez le rat.	114
4.1.1 Poids corporel, ingestion alimentaire et poids du foie et des reins.	114
4.1.2 Effet de l'addition de la CHA sur le métabolisme de l'OTA.	114
4.1.2.1 Concentration de l'OTA dans le plasma.	114
4.1.2.2 Secrétion de l'OTA et de ses métabolites dans la bile et dans l'urine.	115
4.1.2.3 Excrétion de l'OTA et de ses métabolites dans les fèces.	117
4.1.2.4 Enzymurie, fonction rénale et morphologie.	117

4.2 Liaison de l'OTA par la CHA	120
4.2.1. Les études de sorption.	120
4.2.2. Effet de l'addition du NaCl sur la sorption de l'OTA et les AB par la CHA.	123
4.2.3. L'étude de l'interaction entre l'OTA et le TCA pour la liaison avec la CHA.	124
4.3. Rôle des AB dans l'absorption de l'OTA.	125
4.3.1. Débit biliaire et sécrétion des AB dans la bile.	125
4.3.2. Effet de l'interruption de la circulation entérohépatique sur la concentration de l'OTA dans le plasma.	125
CONCLUSION	128
PISTES DE RECHERCHE	129
BIBLIOGRAPHIE	130
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1: Revue de la littérature	Page
Figure 1: Structure chimique générale de l'ochratoxine	5
Figure 2: Métabolisme de l'OTA	1 6
Figure 3: Structure chimique de la cholestyramine	47
Chapitre 2 Article I	
Figure 1: Effect of cholestyramine (CHA) on plasma concentration of ochratoxin A in rats fed diet containing 1 and 3 ppm of the mycotoxin.	81
Figure 2: Effect of CHA on urinary excretion of OTA, OT α and HO-OTA.	82
Figure 3: Effect of CHA on excretion of OTA, OT α and HO-OTA in feces.	83
Figure 4: Effect of CHA on urinary activities of γ GT and NAG in rats fed diet containing 3 ppm of OTA.	84

- Figure 5: Light microscopy of kidney from rat fed diet containing 3 ppm of OTA for 14 days, (A) Without CHA and (B) With addition of 5% CHA. 85

Chapitre 3 Article II

- Figure 1: Isotherms for the binding of OTA and bile salts (TCA and TDC) from NaHCO_3 solution at ambient temperature by cholestyramine. 110
- Figure 2: Effect of OTA on the binding of TCA from NaHCO_3 solution at ambient temperature by cholestyramine. 111

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1: Revue de la littérature	Page
Tableau 1: Principales souches de moisissures qui produisent de l'ochratoxine A.	2
Tableau 2: Les différentes formes d'ochratoxines.	5
Tableau 3: Présence de l'OTA dans les produits d'origine végétale.	7
Tableau 4: Concentration d'OTA dans le sang des truies à l'abattage.	8
Tableau 5: Corrélation entre la teneur d'OTA dans l'aliment et les concentrations résiduelles dans les tissus chez le porc.	9
Tableau 6: Toxicité aiguë de l'OTA.	19
Tableau 7: Présence de l'OTA dans le sang humain et dans le lait maternel.	31
 Chapitre 2: Article I	
Table 1: Effect of CHA on the urinary volume and the faecal weight from rats fed a diet containing 1 and 3 ppm of the mycotoxin.	77

Table 2:	Effect of CHA on the excretion of OTA, OT α and HO-OTA in bile from rats fed a diet containing 1 and 3 ppm of the mycotoxin.	78
Table 3:	Effect of CHA on the excretion of total bile acids in bile and feces in rats fed a diet containing 1 and 3 ppm of the mycotoxin.	79
Table 4:	Effect of CHA on the excretion of creatinine and glucose in the urine from rats fed a diet containing 3 ppm of the mycotoxin.	80

Chapitre 3: Article II

Table 1 :	Maximum binding capacity (Q), binding constants (K) and constants of cooperativity (P) for OTA and bile salts.	106
Table 2:	Effect of NaCl on the sorption of OTA, TCA and TDC by CHA.	107
Table 3:	Binding of OTA and TCA when present singly or in combination with CHA	108
Table 4:	Influence of biliary bile acids on plasma OTA concentrations after a single oral dose of OTA	109

ANNEXE 1:

Tableau 1: Effets des différents traitements sur le poids corporel

Tableau 2: Effets des différents traitements sur l'ingestion alimentaire

Tableau 3: Effets des différents traitements sur la concentration de l'OTA dans le plasma ($\mu\text{g/ml}$)

ANNEXE 2:

Tableau 1: Effet de l'addition de l'acide cholique sur la concentration d'OTA dans le plasma ($\mu\text{g/ml}$)

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.	<i>Aspergillus</i>
A19	Aspartame
AB	Acide biliaire
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AP	Phosphatase alcaline
ATP	Adenosine tri phosphate
C In a	Clairance de l'Inuline
CA	Charbon activé
CAST	Council for Agricultural Science and Technology
CHA	Cholestyramine
CIRC	Centre International de Recherches sur le Cancer
CYP 450	Cytochrome P-450
DL 50	Dose Léthale 50
γGT	γ-glutamyl transférase
FS	Facteur de sécurité
HO-OTA	Hydroxy-ochratoxine A
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPCS	International Programme on Chemical Safety
LAP	Leucine aminopeptidase
NAC	N acétyl cysteine
NAG	N-acétyl-β-D-glucosaminidase
NEB	Néphropathie Endémique des Balkans
nM	nanomolaire
NOEL	No Observed Effect Level
NTP	Programme National de Toxicologie
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTα	Ochratoxine alpha
OTA	Ochratoxine A

OTB	Ochratoxine B
OTC	Ochratoxine C
P	<i>Penicillium</i>
PC	Poids corporel
PDI	Probable Daily Intake
PHS	Prostaglandine synthétase
RNA	Acide ribonucléique
TCA	Acide taurocholique
TDC	Acide taurodéoxycholique
TDI	Tolerable Daily Intake
TD ₅₀	Dose à laquelle 50% des animaux développeraient le cancer
T _m PAH	Transport maximal de l'acide para-aminohippurique

I - Généralités sur l'ochratoxine

I.1 L'ochratoxine A

I.1.1 Source

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par plusieurs espèces de moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Frisvad et Samson, 1991; Varga *et al*, 1996). Elle a été isolée pour la première fois en Afrique du Sud dans des cultures d'*Aspergillus ochraceus*, lors d'une recherche systématique de mycotoxines, d'où origine sa dénomination (van der Merwe *et al*, 1965; de Scott, 1965). Des recherches ultérieures ont révélé que diverses autres moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* peuvent aussi sécréter des ochratoxines (Krogh, 1978) (Tableau 1). Ces moisissures sont ubiquitaires et leur pouvoir de contamination des denrées alimentaires destinées à l'homme et aux animaux est très étendu.

Les études mycologiques indiquent que dans les grains de céréales, l'OTA est surtout sécrétée par les espèces de *Penicillium* (Holmberg *et al*, 1990). Le *Penicillium viridicatum* avait été isolé et considéré comme un producteur de l'OTA (van Waalbeek *et al*, 1969). En 1987, Pitt a clairement montré que, en se basant sur des études regroupant les caractères morphologiques, le taux de croissance ainsi que la production de la toxine, le *P. verrucosum* et non le *P. viridicatum* est producteur de l'OTA. Ces travaux ont été confirmés par les études de Frisvad et Filtenborg (1989).

Tableau.1: **Principales souches de moisissures qui produisent de l'ochratoxine A.**

Souches	Espèces
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. Commune</i> <i>P. Cyclopium</i> <i>P. Politans</i> <i>P. Nordicum</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. Ochraceus</i> <i>A. Alliaceus</i> <i>A. Elegans</i> <i>A. Fresenii</i> <i>A. Melleus</i> <i>A. Ostianus</i>

(D'après Krogh, 1987; Steyn, 1993)

I.1.1.1 Facteurs affectant la production d'OTA

L'influence des facteurs environnementaux sur la production d'OTA par *A. ochraceus* et par *P. verrucosum* dans un milieu synthétique et semi-synthétique a fait l'objet de plusieurs études (Lai *et al*, 1970; Northolt *et al*, 1979; Boley et Muller, 1986; Cvetnik et Pepeljnjak, 1990).

La quantité d'OTA produite par les différentes espèces de moisissures dépend de plusieurs facteurs, à savoir l'activité de l'eau (A_w), la température, le taux d'humidité, le genre ainsi que la composition de l'aliment (Lillehoj et Elling, 1983; Kuiper-Goodman et Scott, 1989; Marquardt *et al*, 1990; Marquardt et Frohlich, 1992; Miller, 1995).

a- Température et humidité

La production de l'OTA par les espèces d'*Aspergillus* ne paraît possible que dans des conditions d'humidité et de température élevées telles que rencontrées en Australie, en Yougoslavie, dans certains pays d'Afrique et où *A. Ochraceus* est le principal producteur d'OTA. Par contre, certaines espèces de *Penicillium* sont capables de produire l'OTA même à des températures n'excédant pas 5°C, comme dans les pays scandinaves et le Canada (Marquardt et Frohlich, 1992).

Plusieurs études récentes ont porté sur la production de l'OTA dans les produits alimentaires stockés dans des conditions de température et d'humidité contrôlées. Ainsi, un blé dont l'humidité initiale est de 20.5% renferme trois fois plus d'OTA (42 ng/g) à 20°C qu'à 15°C, après un entreposage de 10 semaines (Abramson *et al*, 1990). À un taux d'humidité initial de 21 %, la concentration d'OTA dans le maïs stocké pendant 8 semaines atteint un maximum de 3.6 µg/g, alors qu'elle était totalement absente à un taux de 16 % (Abramson *et al*, 1985).

b- Substrat

Le substrat sur lequel les espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* se développent est un facteur déterminant dans la production d'OTA (Holmberg, 1992). Ainsi, il a été démontré que la production d'OTA par *A. ochraceus* est plus élevée dans un substrat composé de graines oléagineuses (arachide et soya) que dans celui qui est composé de céréales (maïs et blé). Cependant, les céréales constituent un bon substrat pour la production d'OTA par le *P. verrucosum* (Madhyastha *et al*, 1990).

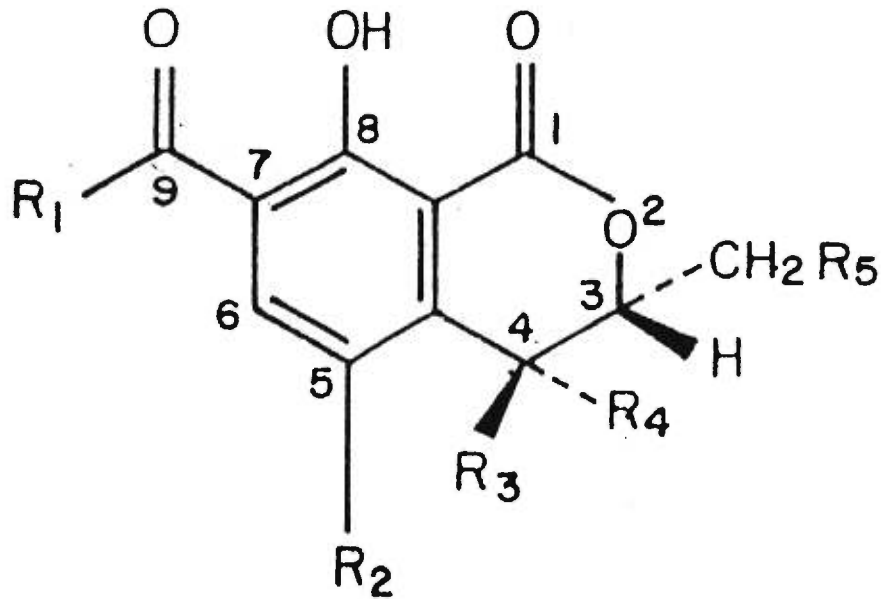
I.1.2 Structure chimique

Les ochratoxines représentent le premier groupe de mycotoxines découvert après les aflatoxines. Elles forment un groupe de composés dont la structure est caractéristique. On les classe, à cause de leur biosynthèse, en tant que pentacétides, inclus dans le groupe des polycétides (Turner, 1971). Elles sont constituées d'une molécule de dihydroisocoumarine (7-carboxy-5-chloro 8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine) reliée par une liaison peptidique à L- β -phénylalanine (Figure 1). L'OTA est une substance cristalline qui, à la lumière naturelle, est incolore, mais émet une fluorescence bleue sous un rayonnement ultraviolet (Chu, 1974; IARC, 1993).

Il existe plusieurs formes chimiques d'ochratoxine (OTA, OTB et OTC) et chacune d'elle diffère par son potentiel toxique (Tableau 2). L'OTA et l'OTC sont très toxiques. L'OTB, la forme déchlorée de l'OTA, et ses esters (méthylé et éthylé) sont moins toxiques que l'OTA et l'OTC (Steyn, 1984). Seule l'OTA et, très rarement l'OTB, ont été identifiées en tant que contaminants des denrées alimentaires (OMS, 1980). Les autres ochratoxines n'ont été isolées que dans des cultures fongiques en conditions de laboratoire.

La souche *Aspergillus ochraceus* n° NRRL 3174 cultivée en milieu liquide ou solide est capable de produire des analogues naturels de l'OTA dans lesquels la phénylalanine est remplacée par un autre acide aminé. Plusieurs de ces analogues ont déjà été isolés et identifiés (Hadidane *et al*, 1992). Ils présentent une cytotoxicité variable en fonction de l'acide aminé dont ils dérivent (Creppy *et al*, 1983).

Quelquefois les moisissures qui produisent l'OTA peuvent produire simultanément d'autres mycotoxines ou cohabiter avec d'autres moisissures qui produisent des toxines différentes, telles que la citrinine produite par certains *Penicillium* (Kanisawa, 1984) ou les aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* (Steyn, 1993). Ces mycotoxines et bien d'autres présentent des synergies avec l'OTA, ce qui peut poser des problèmes quant à l'attribution des effets toxiques observés.

Fig. 1 Structure chimique générale de l'ochratoxine.Tableau. 2: Les différentes formes d'ochratoxines

Dénomination	Abbréviation	R1	R2	R3	R4	R5
Ochratoxine A	OTA	Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	OTB	Phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine C	OTC	Phénylalanine, ethyl ester	Cl	H	H	H
Ochratoxine α	OT α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OT β	OH	H	H	H	H
4R- hydroxyochratoxineA	OH-OTA	Phénylalanine	Cl	H	OH	H
4S- hydroxyochratoxineA	OH-OTA	Phénylalanine	Cl	OH	H	H
10-hydroxyochratoxineA	OH-OTA	Phénylalanine	Cl	H	H	OH

(D'après Marquardt et Frohlich, 1992)

I.1.3 Contamination des aliments par l'OTA

Dans tous les pays où des études en vue de détecter l'OTA ont été menées, l'OTA a été retrouvée aussi bien dans les aliments (céréales, fruits secs, haricots, café, cacao, bière, etc..) que dans le sang humain et celui des animaux tel que porcins et volailles (Krogh, 1987; Kuiper-Goodman et Scott, 1989; Speijers et Van Egmond, 1993).

I.1.3.1 Origine végétale

Les données concernant la présence de l'OTA dans les produits alimentaires ont fait l'objet de plusieurs publications (Krogh, 1987; Jelinek *et al*, 1989; IARC, 1993; Speijers et Van Egmond, 1993) (Tableau 3). Elles proviennent surtout des pays européens, en particulier les pays scandinaves, les pays de l'Europe de l'Est et de la région des Balkans. Le taux de contamination varie considérablement selon la région.

L'OTA a d'abord été détectée comme contaminant naturel du maïs (Shotwell *et al*, 1969). En fait, elle contamine toutes les céréales (notamment le blé, l'orge...). Elle a été trouvée dans certains grains de céréales (blé, orge, riz et avoine), grains de légumineuses (pois, haricot, fève.), oléagineuses (soja, arachide, coton) et café, dans plusieurs pays (Chelkowski, 1991)).

En 1987, Krogh a fait la synthèse des multiples enquêtes portant sur la présence d'OTA dans les aliments. Il a trouvé que 1 à 30% des produits alimentaires sont contaminés par l'OTA. Aux États-Unis et au Canada, le taux est de 1 à 14%. La moyenne de la concentration trouvée dans les différentes enquêtes est de 1.035µg/kg; avec 83% des échantillons renfermant une quantité < 200 µg/kg; environ 3% ont des taux très élevés (20000-30000 µg/kg). Au Canada, la concentration moyenne trouvée dans les aliments pour les animaux est de 30 - 6000µg/kg, elle est de 10 - 50 µg/kg dans les céréales pour la consommation humaine (Marquardt *et al*, 1990; Marquardt et Frohlich, 1992; Miller, 1995).

Tableau 3 : Présence de l'OTA dans les produits d'origine végétale

Pays	Produit	Année	N°Positif/Total	Teneur (µg/kg)
Canada	Blé, seigle	71-75	7/95	30-6000
USA	Maïs	68-69	3/293	80-170
Brésil	Pois	85-86	2/13	90,160
Bulgarie	Maïs	84-89	103/264	0.2-1418
Allemagne	orge	82-87	10/68	0.1-206
France	Maïs	73	18/924	5-200
Pologne	Céréales	84-85	158/1353	5-2400
Suède	Pois	76-79	6/91	10-442
Royaume Uni	Céréales	76-79	12/243	5-108
Yougoslavie	Blé	72-76	11/130	19-100
Égypte	Blé		1/3	10
Sénégal	Pois	84-88	5/31	34
Tunisie	Blé	82-83	3/10	34-360
Inde	Riz	81	2/32	8,25
Indonésie	Maïs	85-86	1/26	3
Japon	Farine	77-82	11/11	2.5-20

(D'après IARC, 1993; Kuiper-Goodman et Scott, 1989; Krogh, 1987)

Les quantités d'OTA présentes dans l'alimentation animale sont généralement supérieures à celles retrouvées dans les aliments destinés à la consommation humaine (Pohland *et al*, 1992). La contamination est également plus fréquente dans le cas du fourrage (Krogh, 1992) et ceci est probablement dû à de moins bonnes conditions de conservation, ces conditions étant moins réglementées (Pfohl-Leszkowicz, 1994a).

I.1.3.2 Origine animale

Comparée aux aflatoxines, une grande proportion de l'OTA est transmise de l'alimentation animale aux tissus de ces animaux (Kuiper Goodman et Scott, 1989). L'OTA a été détectée dans le sang et dans les tissus des truies dans divers pays incluant le Canada (Elling *et al*, 1975; Rutqvist *et al*, 1978; Krogh, 1987; Pohland *et al*, 1992; Speijers et van Egmond, 1993; Prelusky, 1994) (Tableau.4).

Tableau 4 : **Concentration d'OTA dans le sang des truies à l'abattage**

Pays	Année	N°Positif/Total	Concentration (ng/ml)
Allemagne	82-83	93/191	0.1-67
Canada	86	813/1006	10-229
Pologne	83-84	335/894	2.03
Suède	82-83	26/112	2-62
Yougoslavie	79	16.6%	36-77

(D'après IARC, 1993)

Le transport de l'OTA entre les aliments du bétail et les tissus des animaux a été bien clarifié grâce à des études dans lesquelles des groupes de porcs ont été exposés durant 3 à 4 mois à des taux d'OTA de 200, 1000 et 4000 µg/kg d'aliment (Krogh *et al*, 1974; Mortenson *et al*, 1983). À la fin de l'exposition (abattage), c'est dans les reins qu'ont été décelées les concentrations maximales d'OTA (concentration tissulaire moyenne: 50 µg/kg pour un taux de contamination de 4000µg/kg d'aliment). Notons que les concentrations étaient un peu moindre dans le foie, les muscles et le tissu adipeux. Krogh *et al* (1976) ainsi que Mortenson *et al*, (1983) ont montré l'existence d'une corrélation positive entre la teneur en OTA dans l'alimentation animale et les résidus d'OTA dans les différents tissus (Tableau 5).

Tableau 5: Corrélation entre la teneur d'OTA dans l'aliment et les concentrations résiduelles dans les tissus chez le porc.

Tissu	Equation de régression	r
Rénal	$Y = 2.15 + 0.0123 X$	0.86
Hépatique	$Y = 0.35 + 0.0095 X$	0.82
Adipeux	$Y = 2.51 + 0.0099 X$	0.78

(D'après Krogh *et al*, 1976; Mortenson *et al*, 1983)

X= teneur d'OTA dans l'aliment ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Y= OTA résiduelle dans les tissus ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de tissu)

r = Coefficient de corrélation

D'autres études utilisant des porcs soumis à un régime contenant de l'OTA à différentes doses ont montré que la concentration d'OTA est plus élevée dans le sang (25 à 75%) alors qu'elle n'est que de (2.5 à 5%) dans les reins et de (1 à 2%) dans les muscles et le foie . Il faut noter que de faibles concentrations ont été signalées dans le tissu adipeux (Hult *et al*, 1979; Mortenson *et al*, 1983). La teneur d'OTA plasmatique est utilisée comme indicateur de la contamination des aliments et par ce fait, on peut en prédire la concentration dans les différents tissus (Holmberg *et al*, 1990) Lorsque les truies en gestation sont alimentées avec une diète contaminée par l'OTA, la toxine peut être détectée dans le placenta, sans toutefois atteindre le foetus (Patterson *et al*, 1976; Shreeve *et al*, 1977). De plus, Mortenson *et al* (1983) n'ont pas trouvé d'OTA, ni dans le lait de la truie, ni dans la viande de porcelets.

L'OTA est considérée comme étant la mycotoxine la plus toxique pour la volaille. Contrairement à la réponse à d'autres mycotoxines (trichotécènes, zéaralénones), la volaille est très sensible à de faibles teneurs en OTA (Leeson *et al*, 1995). On a rapporté des concentrations de l'ordre de $29\mu\text{g}/\text{kg}$ d'OTA dans des échantillons de tissu musculaire de poules et de poulets consommant une

diète contaminée par l'OTA à de très faibles concentrations (Elling *et al*, 1975; Krogh, 1987; Prelusky, 1994). Dans une autre étude, des groupes de poules ont été exposés pendant 1-2 ans à des taux d'OTA de 0.3 et 1 mg/kg de diète. Les concentrations maximales ont été observées dans les reins, la moyenne étant de 19 µg/kg de tissu rénal chez les animaux du groupe consommant la diète contaminée par 1 mg/kg; dans le foie et les muscles, les concentrations résiduelles en OTA sont moindres. Aucun résidu d'OTA n'a été décelé dans les oeufs (Krogh *et al*, 1978).

Les résidus d'OTA ne sont pas généralement présents dans les tissus des ruminants ou dans le lait provenant de ces ruminants (Krogh, 1987). Ceci peut être expliqué par la capacité qu'a la flore bactérienne du rumen de métaboliser l'OTA en un métabolite OT α (forme hydrolysée) non toxique (Chu, 1974; Delacruz et Bach, 1990). Le métabolite OT α a été retrouvé dans les reins à un taux < 10µg/kg ainsi que dans le sang des veaux consommant une diète contenant 300-500 µg d'OTA/kg (Patterson *et al*, 1981). Shreeve *et al* (1979) ont rapporté que chez deux vaches laitières alimentées avec une diète contaminée par l'OTA à des taux de 317-1125 µg/kg pendant 11 semaines, une quantité de 5 µg/kg a été retrouvée dans les reins chez un seul animal mais non dans d'autres tissus ou dans le lait. Sreemannarayana *et al* en 1988 ont montré que chez les jeunes veaux, approximativement 90% de l'OTA est excrétée sous la forme OT α , et 4 à 8 fois plus excrétée dans l'urine que dans les fèces. Une quantité < 2 % est excrétée sous la forme OTA dans l'urine et dans les fèces.

I.2 Pharmacocinétique

I.2.1 Absorption, distribution et transport

L'OTA possède les propriétés physico-chimiques des acides faibles à cause de ses fonctions phénoliques et carboxyliques (pka de 7.1 et 10.25). Dans un milieu acide, l'OTA est soluble dans les solvants organiques et donc lipophile; et en milieu alcalin, elle est soluble dans l'eau. La toxine peut exister sous une forme ionisée ou non-ionisée, selon le pH du milieu (Galtier *et al*, 1977). Le pH du digesta pourrait affecter le taux d'absorption de l'OTA, ce taux serait plus rapide dans les régions du tractus gastrointestinal qui ont un pH bas que dans les régions où le pH est plus élevé (Marquardt et Frohlich, 1992). La diffusion passive de la forme non-ionisée au pH acide de l'estomac semble être un mécanisme majeur de l'absorption de l'OTA. Galtier (1974a) a montré que la concentration d'OTA est maximale dans la paroi gastrique durant les quatre premières heures suivant l'administration d'une dose unique d'OTA (10 mg/kgPC) par gavage à des rats. L'intestin grêle, le gros intestin et le caecum contenaient de faibles quantités. Théoriquement, l'OTA devait être moins bien absorbée dans le jéjunum et dans l'intestin. Une investigation récente a toutefois montré que l'OTA est aussi absorbée au niveau du jéjunum proximal et que la principale route de transport est la veine porte (Kumagai et Aibara, 1982). En effet, même en présence de concentrations plasmatiques d'OTA plus élevées que les concentrations intestinales, la toxine passe préférentiellement de l'intestin vers le sang (Kumagai, 1988). Ce processus semble relever d'un transport actif. Dans une autre étude utilisant [³H] OTA, Roth *et al* (1988) ont montré que l'absorption est rapide à partir de l'estomac, mais que les résultats obtenus supportent également une absorption intestinale vu la rapidité du transit de l'OTA de

l'estomac vers l'intestin. Par contre, Lee *et al.* (1984), ont suggéré que l'absorption peut avoir lieu au niveau de l'oesophage, du duodénum et à un degré moindre dans le jéjunum. En plus de la voie gastro-intestinale, la toxine peut être absorbée par les poumons. Di Paolo *et al* (1993) ont rapporté le cas d'un fermier qui avait développé un stress respiratoire temporaire et une atteinte rénale aiguë suite à l'inhalation de l'OTA.

Le pourcentage d'OTA absorbée varie selon les espèces: il est de 66% chez le porc, 56% chez le lapin et de 40% chez le poulet (Galtier *et al*, 1981). Il faut noter que la concentration maximale en OTA plasmatique a été observée sur une période de 2h à 10h chez le rat et chez le porc (Galtier *et al*, 1981; Mortenson *et al*, 1983), de 2h à 4h chez les veaux (Sreemannarayana *et al*, 1988) et de 1h et 0.33h respectivement chez le lapin et le poulet (Galtier *et al*, 1981) après administration de la toxine par voie orale.

Une fois absorbée à partir du tractus digestif, l'OTA circule dans le sang, liée aux protéines plasmatiques et, en particulier, à l'albumine (Chu, 1971; Galtier *et al*, 1974, 1979; Stojkovic *et al*, 1984; Kumagai, 1985). Cette liaison est de 99% à 100% chez les mammifères alors qu'elle ne l'est que de 78% chez les poissons (Galtier *et al* 1981; Hagelberg *et al* 1989). Ce processus non seulement facilite l'absorption passive de la forme non ionique mais aussi retarde son élimination et contribue conséquemment à augmenter la demi-vie de la toxine (Kumagai, 1985). La demi-vie est de 510 h pour les singes, 90h pour la truie, 55h à 120h pour le rat, et < 12h pour les poissons et les oiseaux (Galtier, 1991; Hagelberg *et al* 1989)

Le rôle de l'albumine dans la pharmacocinétique de l'OTA a été clairement démontré par les travaux de Kumagai (1985) portant sur des rats déficients en albumine (concentration d'albumine \approx 1% de celle des rats normaux). Ces rats éliminaient plus rapidement l'OTA (20 à 70 fois) que les rats normaux et l'auteur

a suggéré que l'un des effets de la liaison de l'OTA à l'albumine pourrait être le retard de son élimination, en limitant son transfert de la circulation sanguine vers les cellules hépatiques et rénales.

Stojkovic *et al* en 1984 ont montré qu'il existe un constituant plasmatique dont le poids moléculaire est de 20000 kdal qui peut lier l'OTA plus spécifiquement que l'albumine. Cette molécule peut facilement traverser la membrane glomérulaire, favorisant ainsi son accumulation dans le rein, ce qui contribue à son effet néphrotoxique (Marquardt et Frohlich, 1992).

Des constantes d'affinités pour l'albumine ont été déterminées pour l'humain et le porc: $2.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ et $0.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ respectivement (Stojkovic *et al*, 1984; Sigrid et Hult, 1989). Il faut noter que la liaison de l'OTA à l'albumine peut avoir des conséquences sur l'efficacité de certains médicaments tels que phenylbutazone, piroxicam, ethylbiscoumacetate et sulfamethoxy pyridazine qui ont la propriété de se lier aussi à l'albumine. Des travaux *in vitro* utilisant l'albumine porcine ont démontré que ces médicaments entrent en compétition avec l'OTA sur les sites de liaison de l'albumine, et cela entrave l'action thérapeutique de ces médicaments qui sont largement utilisés en médecine vétérinaire et aussi chez l'humain (Galtier *et al*, 1984). Les conséquences peuvent consister d'une part en une libération d'OTA à la suite d'une prise médicamenteuse, d'autre part à une augmentation de la forme libre d'un médicament ayant une moindre affinité avec de possibles répercussions sur sa distribution et son activité pharmaco-toxicologique (Galtier *et al*, 1993).

Pour son transport intra-rénal, l'OTA utilise les voies du succinate, du sulfate et du para-aminohippurate (PAH) (Ullrich *et al*, 1991). L'OTA entre donc en compétition avec les anions organiques (dont le PAH) (Sokol *et al*, 1988) pour son absorption rénale, et aussi avec les cations organiques dont l'acétate de tétraéthylammonium (Creppy *et al*, 1996). De plus, l'OTA utilise le même transporteur que le probénicide. Les concentrations de probénicide de l'ordre de

$3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ à $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ peuvent inhiber l'OTA. Tous ces systèmes de transport nécessitent en général de l'ATP. Or l'OTA inhibe la production d'ATP par la mitochondrie *in vitro* pour des concentrations de l'ordre de $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Friis *et al*, 1988; Sokol *et al*, 1988; Jung et Endou, 1989). Dans les cellules d'origine rénale, l'OTA inhiberait les canaux chlore. Cette dernière propriété n'aurait peut être pas cependant une importance déterminante dans la toxicité puisqu'elle siègerait au niveau du tubule rénal post-proximal. Il faut noter aussi que l'OT α et l'OTB, composés non toxiques, pourraient également inhiber les mêmes canaux (Gekle *et al*, 1993). De plus, un tel blocage des canaux chlore induit une alcalinisation du milieu intracellulaire qui devrait favoriser la solubilité dans l'eau de la molécule et son élimination.

I.2.2 Métabolisme de l'OTA

L'OTA entre dans la circulation par la veine porte (Kumagai et Aibara, 1982) et peut être absorbée par les vaisseaux lymphatiques. Une fois dans le sang, l'OTA se lie fortement à l'albumine (Chu, 1971; Galtier *et al*, 1981) ainsi qu'à d'autres macromolécules (Stojkovic *et al*, 1984). La fraction libre de l'OTA dans le plasma est très basse chez toutes les espèces de mammifères et d'oiseaux, c'est à dire moins que 0.2% (Hagelberg *et al*, 1989).

I.2.2.1 Hydrolyse

L'OTA est hydrolysée par des peptidases (carboxypeptidase) en un métabolite ochratoxin α (OT α) non toxique (Pitout, 1969) et la phénylalanine (Fig.2). Il est à noter qu'une étude récente a montré que l'OT α pourrait être génotoxique (Follmann *et al*, 1995). Ainsi, Madhyastha *et al* (1992a) ont montré que chez le rat, les digestas du ceacum et du colon sont capables d'hydrolyser l'OTA, cette activité demeure cependant très faible au niveau de l'intestin grêle et de l'estomac et inexistante dans le foie et le rein (Kanisawa *et al*, 1977; Suzuki *et al*, 1975; Stormer *et al*, 1983, Madhyastha *et al*, 1992a). Des études *in vitro*

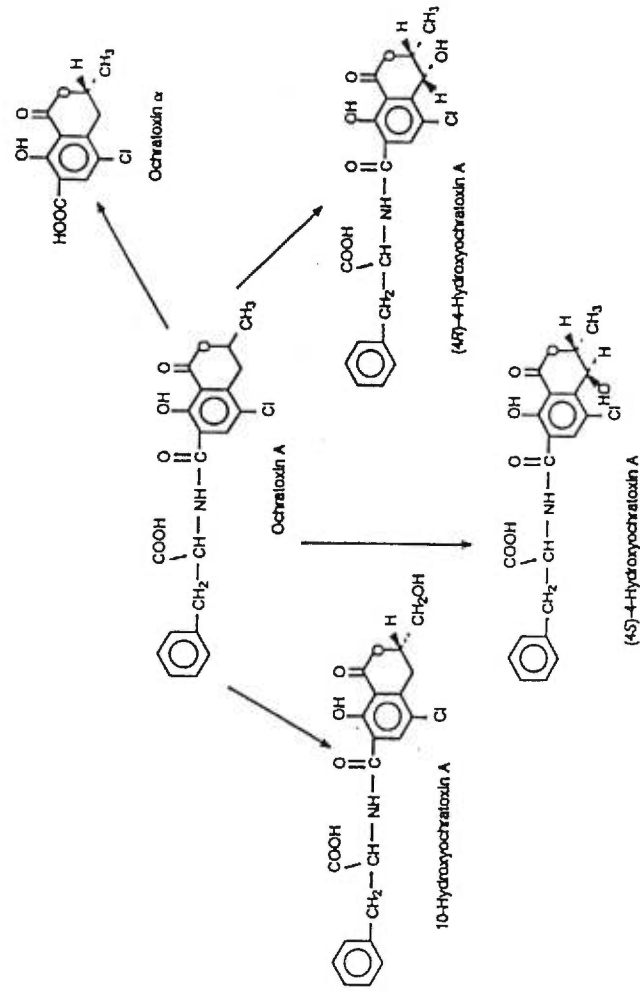
utilisant les contenus des 4 estomacs de vache indiquent l'efficacité de l'hydrolyse de l'OTA par la flore microbienne de ces estomacs. Il a été estimé qu'un aliment contaminé avec l'OTA jusqu'à 12 ppm d'OTA peut être dégradé par la flore microbienne (Hult *et al*, 1976), ce qui montre que les ruminants sont relativement résistants à l'OTA.

I.2.2.2 Hydroxylation

En plus de l'hydrolyse, l'OTA peut être hydroxylée par plusieurs sous-familles de cytochrome P-450 (CYP 450). En présence de NADPH et de microsomes de foie de porc, de rat et d'humain, l'OTA est métabolisée en divers composés hydroxylés, les 4 [R]et 4[S]-4- hydroxyochratoxine A (Stormer *et al*, 1981; Ueno, 1985; Chakor *et al*, 1988 ; Castegnaro *et al*, 1989; Oster *et al*, 1991; Hennig *et al*, 1991; Fink-Gremmel *et al*, 1993; 1995). Dans les mêmes conditions et avec des microsomes de lapin, l'OTA est transformée en 10-hydroxyochratoxine A (Stormer *et al*, 1985; Stormer, 1992) (Figure 2).

Il a été également montré que l'OTA est un substrat de la phénylalanine hydroxylase qui la transforme en partie en tyrosine-ochratoxine A. Ce dérivé est cytotoxique tout comme la 4 [R]-4- hydroxyochratoxine A qui, de plus, est immunosuppressive (Creppy *et al*, 1983). De nombreuses données indiquent de plus en plus que le métabolisme de l'OTA est aussi impliqué dans sa génotoxicité (Suzuki *et al*, 1986; Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1993a; Grosse *et al*, 1995). Outre le polymorphisme génétique qui serait impliqué dans le métabolisme de l'OTA (Hietanen *et al*, 1986; Castegnaro *et al*, 1989), il est important de rappeler les effets inducteurs et inhibiteurs des enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Ainsi le phénobarbital et le méthylcholanthène inducteurs des enzymes du CYP-450 diminuent la toxicité de l'OTA (DL50 est augmentée) (Moroi *et al*, 1985; Chakor *et al*, 1988).

Figure 2: Métabolisme de l'ochratoxine A



(D'après Storen *et al*, 1982; Stormer *et al*, 1983)

On a rapporté toutefois une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques chez la souris (Suzuki *et al*, 1986). Ceci indique que certains des métabolites formés sous l'effet de cet inducteur sont moins toxiques que l'OTA mais restent génotoxiques et cancérogènes. Il faut signaler qu'un ou plusieurs métabolites formés par d'autres voies métaboliques pourraient également être génotoxiques. C'est le cas de la tyrosine-OTA (Creppy *et al*, 1990). L'addition de la phénylalanine n'a aucun effet protecteur contre les effets génotoxiques de l'OTA *in vivo*, alors que cette dernière protégeait contre l'intoxication aiguë et empêchait l'inhibition de la synthèse des protéines.

La toxicité de l'OTA est augmentée par le pipéronyl butoxyde, puisque que ce dernier est un inhibiteur du CYP-450 et des enzymes microsomales (Chakor *et al*, 1988). Il apparaît donc clairement que la toxicité, la génotoxicité et la cancérogénicité de l'OTA sont fortement influencées par son métabolisme.

I.2.2.3 Circulation entérohépatique

L'OTA administrée par voie orale chez les rongeurs subit un cycle entérohépatique (Roth *et al*, 1988; Fuchs *et al*, 1988) dû à son élimination biliaire associée à une importante réabsorption intestinale (Fuchs *et al*, 1988). Cette excrétion dans la bile peut entraîner des perturbations dans la formation de d'autres molécules qui sont aussi sécrétées par la voie biliaire. Ainsi, les concentrations hépatiques et l'excrétion biliaire de la tétracycline sont diminuées chez les rats soumis à une ochratoxicose chronique mais pour lesquels le débit biliaire reste normal (Galtier *et al*, 1984). À l'inverse, certains médicaments agissant au niveau intestinal (cholestyramine, charbon actif..) perturbent le devenir normal de la toxine (Galtier *et al*, 1993). Roth *et al* (1988) ont démontré que la cholestyramine, agent séquestrant les acides biliaires, pouvait limiter la circulation entérohépatique de la toxine. Plus récemment, Madhyastha *et al*. (1992b) ont prouvé la capacité de cette même substance à réduire la biodisponibilité plasmatique et l'excrétion urinaire de l'OTA en diminuant son absorption intestinale et favorisant son élimination fécale.

I.2.3 Excrétion

L'excrétion biliaire et la filtration glomérulaire jouent un rôle important dans l'élimination de l'OTA de l'organisme. Des études portant sur le rat, à l'aide de l'OTA marquée au ^{14}C , ont permis de constater que cette toxine est principalement excrétée dans l'urine, bien qu'une faible proportion soit excrétée par voie fécale (Galtier *et al*, 1974b; Chang et Chu, 1977). Storen *et al* (1982) ont rapporté que 32-36% de l'OTA administrée par voie orale à un rat sont excrétées dans l'urine : 25-27% sous la forme d'OT α , 6% d'OTA et seulement 1.5% sous la forme (4R)-4-hydroxyOTA. Par contre dans les fèces, ce taux est de 12% et 9% respectivement pour l'OTA et l'OT α . Il faut noter que la volaille a tendance à éliminer l'OTA plus vite que les mammifères (Leeson *et al*, 1995). Ainsi chez les poussins ayant reçu l'OTA marquée, 90% de la radioactivité est excrétée 48 h après le gavage (Frye et Chu, 1977). Par contre, un temps plus long (4 à 5 jours) est nécessaire pour éliminer la totalité de l'OTA contenue dans les organes du porc alimenté avec une diète contaminée par 1 ppm d'OTA. Donc, afin de contrecarrer la contamination de la chaîne alimentaire, il serait prudent d'alimenter les porcs avec une diète non contaminée par l'OTA durant un mois avant l'abattage (Hald, 1989).

Compte tenu de la néphrotoxicité potentielle de l'OTA, les mécanismes de son élimination rénale ont fait l'objet d'études *in vivo* et *in vitro*. L'excrétion urinaire de l'OTA a souvent été mise en parallèle avec sa néphrotoxicité. Le mécanisme de l'excrétion repose sur une interaction de la toxine avec les transporteurs des anions organiques et sur une filtration glomérulaire suivie de sécrétion et réabsorption tubulaires (Stein *et al*, 1985; Sokol *et al*, 1988; Zingerle *et al*, 1997).

L'excrétion de l'OTA dans le lait humain et animal a aussi été rapportée (Galtier *et al*, 1977; Nip et Chu, 1979; Bauer et Gareis, 1987; Jonsyn *et al*, 1995).

I.3 Étude de la toxicité induite par l'OTA chez les animaux

I.3.1 Toxicité aiguë

La toxicité de l'OTA est très variable. L'espèce, le sexe, la voie d'administration modifient la toxicité de l'OTA (Tableau.6): la dose létale 50 (DL 50) varie de 3.4 mg/kg de poids corporel chez le pigeon à 68 mg /kg chez la souris mâle par voie orale. Il apparaît que de tous les animaux, le porc et le chien sont les plus sensibles à l'OTA. Les rongeurs y sont nettement moins sensibles (Galtier *et al*, 1974c; Kanisawa *et al*, 1978; Ngaha, 1985). La voie intrapéritonéale est plus toxique que la voie orale.

Tableau 6 : **Toxicité aiguë de l'OTA**

Animal	DL50 (mg/kg poids)	Voie d'administration
Souris femelle	22	ip
rat mâle et femelle	12.6-14.3	ip
Truite	4.7	ip
Souris mâle	51-68	orale
Rat mâle et femelle	21.4-30.3	orale
Caille	16.5	orale
Cobaye mâle et femelle	8.1-9.1	orale
Dinde	5.9	orale
Pigeon	3.4	orale
Chien	<9	orale
Truie et porc	<6	orale

(D'après Creppy *et al*, 1995b)

I.3.2 Toxicité subchronique et chronique

I.3.2.1 Néphrotoxicité

L'organe cible principal de la toxicité induite par l'OTA est le rein. De nombreuses études de la toxicité aussi bien subchronique que chronique ont montré que l'OTA est potentiellement néphrotoxique pour toutes les espèces étudiées (Elling *et al*, 1975; Berndt et Hayes, 1979; Elling *et al*, 1985; Kane *et al*, 1986b; Krogh, 1978; Kuiper-Goodman et Scott, 1989), exception faite des ruminants adultes (Ribelin *et al*, 1978). La contamination de l'alimentation animale par l'OTA a été associée à la néphropathie porcine et aviaire (Hult *et al*, 1984). Krogh *et al* (1974; 1976) ont pu reproduire une néphropathie respectivement chez le porc et le poulet après une consommation d'une diète contaminée par l'OTA. Il faut noter que l'OTA exerce un effet toxique aussi bien au niveau de la fonction rénale qu'au niveau de la morphologie du rein (Kuiper-Goodman et Scott, 1989). Chez les animaux atteints de néphropathie, les reins deviennent pâles et augmentent considérablement de taille (trois fois plus gros que les reins normaux) (Rutqvist *et al*, 1978; Elling *et al*, 1985) L'atteinte rénale est surtout localisée dans la partie proximale des tubules contournés. Elle est caractérisée par une dégradation de la fonction tubulaire qui se traduit par le déclin du rapport Tm_{PAH}/C_{in} (transport maximal de l'acide para-aminohippurique)/ C_{in} (clairance de l'inuline) et la diminution de la capacité à concentrer l'urine. L'OTA est captée par les cellules tubulaires proximales par l'intermédiaire du système de transport des anions organiques (Friis *et al*, 1988). L'étude de Berndt et Hayes, en 1979, a démontré que l'OTA pouvait inhiber à la fois le système de transport des anions et des cations. Par contre Sokol *et al* (1988), en utilisant des vésicules de membranes de la bordure en brosse et des vésicules de membranes basolatérales de l'épithélium tubulaire proximal, démontrent que l'OTA n'inhibe que le transport des anions organiques. Il est à noter que dans une étude

récente, Kontaxi *et al* (1996) avaient montré que l'OTA est captée par les hépatocytes via un transporteur des anions organiques, comme c'est le cas avec les cellules rénales. De plus, le probénécide inhibe aussi ce type de transport.

Stein *et al* (1985) notent que la clairance rénale de l'OTA est diminuée par la préadministration de probénécide.

Les effets néphrotoxiques de l'OTA sont toujours proportionnels aux doses de toxine administrée. À doses élevées, les modifications suivantes ont été rapportées: augmentation de l'urée sanguine, protéinurie modérée, glucosurie. Au niveau histopathologique, une dégénérescence des tubules proximaux a été invariablement observée (Albassam *et al*, 1987). Cette lésion se caractérise par un amincissement de la membrane basale. En parallèle, on a observé une enzymurie impliquant les enzymes de la bordure en brosse (γ -glutamyl transférase, γ GT(EC2.3.2.2), phosphatase alcaline, AP (EC 3.1.3.1.) et leucine aminopeptidase, LAP (EC 3.4.1.2.) et une enzyme du lysosome comme la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, NAG (EC 3.2.1.30.) ainsi que l'élimination dans les urines de la β -2 microglobuline (Krogh *et al*, 1974; Kanisawa et Suzuki, 1978, Kane *et al*, 1986b; Baudrimont *et al*, 1995). Les effets cités ci-dessus sont induits par des doses inférieures au 1 mg/kg. Il faut noter d'une part qu'aucun autre organe ou tissu ne présentait d'altérations; d'autre part, que chez des porcs et des chiens traités *per os* à de fortes doses correspondant à des taux alimentaires supérieurs à 5-10 mg/kg, outre les lésions rénales, des effets extrarénaux, au niveau du foie, de l'intestin, de la rate, du tissu lymphoïde et des leucocytes ont été observés (Szczzech *et al*, 1973). Toutefois, les doses utilisées dans cette dernière étude sont nettement supérieures aux valeurs couramment présentes dans les aliments.

I.3.2.2 Cancérogénicité

La cancérogénicité de l'OTA a été soulevée par Purchase et Van der Watt en 1971. Ils ont rapporté des cas de cancer rénaux chez les rats ayant reçu une dose de 300 µg d'OTA /kg PC . En 1978, Kanisawa et Suzuki ont montré que l'OTA est un cancérogène hépatique et rénal chez la souris mâle. Un groupe de 10 souris mâles ayant reçu un régime contenant un taux d'OTA de 40 mg/kg de diète pendant 44 semaines et sacrifié après 49 semaines, a été comparé à un groupe témoin ayant reçu une alimentation normale. Chez les souris traitées, 5 sur 9 avaient des tumeurs hépatiques, 2 sur 9 des tumeurs rénales solides et 9 sur 10 démontraient des adénomes cystiques rénaux. Aucune des pathologies n'a été retrouvée chez les animaux témoins.

Les effets cancérogènes de l'OTA chez la souris ont été corroborés par l'étude de Bendele *et al* (1985a) qui ont utilisé un nombre plus important d'animaux par groupe. Deux groupes de souris (50 mâles et 50 femelles) ont été nourris pendant 24 mois avec un régime contenant 40 mg d'OTA/kg, puis ont été sacrifiés. Parmi les souris mâles traitées, 11 sur 49 avaient des carcinomes rénaux, 24 sur 49 des adénomes rénaux et les 49 animaux souffraient de néphropathies. Par contre, seul un petit nombre de femelles démontrait une néphropathie et aucun carcinome ou adénome rénal n'était décelé. Les groupes témoins n'ont développé aucune tumeur.

L'étude du programme national de toxicologie américain (NTP) (Boorman, 1989) a confirmé le pouvoir cancérogène de l'OTA chez les rats des deux sexes. En effet, l'OTA augmente l'incidence des adénomes et des carcinomes tubulaires rénaux: 72 % des mâles et 16 % des femelles ont développé des néoplasmes après 2 ans de traitement avec 210 µg/kg PC. Les femelles semblent moins sensibles, bien qu'une augmentation de l'incidence des fibroadénomes des glandes mammaires ait été observée. L'OTA provoque également des modifications rénales non néoplasiques comme des hyperplasies, des proliférations cellulaires, des altérations cytoplasmiques, des caryomégalies des

cellules tubulaires et des dégénérescences de l'épithélium tubulaire. Ainsi, à des doses de 70 et 210 µg/kg, tous les rats présentent des caryomégalies et une dégénérescence des tubules rénaux.

À l'évidence, l'OTA doit être considérée comme un cancérogène rénal, du moins lors d'une exposition à long terme. Les travaux du NTP et de Bendele *et al*, 1985a ont permis une nouvelle évaluation de la toxicité de l'OTA. Elle est actuellement classée dans le groupe 2B (Produits considérés comme cancérogènes pour l'homme) par le Centre International de Recherches sur le Cancer (CIRC) (IARC, 1993).

I.3.2.3 Immunotoxicité

À côté de l'effet néphrotoxique de l'OTA, l'aspect immunosuppresseur a été aussi bien étudié. Bien qu'aucun cas d'immunosuppression en rapport avec la contamination par l'OTA n'ait été décrit chez l'humain, de nombreuses études montrent que, dans des systèmes *in vitro*, dans des cellules en culture et chez des animaux d'expérience, l'OTA est un puissant immunosuppresseur (Chang *et al*, 1979; Haubeck *et al*, 1981; Creppy *et al*, 1982, 1983; Lea *et al*, 1989; Stormer et Lea, 1995).

L'OTA administrée à divers animaux provoque des effets variables au niveau de la moelle osseuse et à celui de la réponse immunitaire. L'OTA peut être à l'origine de la lymphopénie, de l'involution thymique et de la suppression de la réponse immunitaire. Ainsi chez la souris, des doses d'OTA intrapéritonéale de l'ordre de 0.5 à 1 µg/kg abaissent de plus de 70% la réponse immunitaire, telle qu'évaluée par la production d'IgM (immunoglobuline M) et d'IgG (immunoglobuline G) en réponse à des globules rouges de moutons. L'effet immunosuppresseur de l'OTA peut être prévenu par un traitement simultané avec la phénylalanine à une dose deux fois supérieures à celle de l'OTA (Haubeck *et*

al, 1981; Creppy *et al*, 1982, 1983), ce qui indique que le mécanisme en cause est directement lié à l'inhibition de la synthèse des protéines par l'OTA. Parmi les animaux, le porc est le plus sensible à l'OTA. Des études ont montré qu'avec une dose 0.06 mg/kg d'OTA, une inhibition de 10% de la réponse immunitaire est observée dans les conditions normales d'élevage (Hult *et al*, 1980, 1984). Lea *et al*, 1989 ont montré que tous les types de lymphocytes sont affectés suite à l'exposition à l'OTA. Cette immunosuppression pourrait avoir des conséquences importantes au niveau de l'élevage, car elle prédispose les animaux aux maladies bactériennes et virales.

I.3.2.4 Tératogénicité

L'OTA est tératogène et provoque des anomalies morphologiques diverses chez le rat (Brown *et al*, 1976), la souris (Mayura *et al*, 1982, 1984; Arora et Frolen, 1981) et le poulet (Gilani *et al*, 1978). Ainsi, des anomalies touchant les membres, le cou, les viscères et la taille ont été notées chez les embryons de poulet après l'injection d'OTA dans la poche d'air d'oeufs fertilisés, à une dose de 0.005 mg par oeuf (Gilani *et al*, 1978).

De même, l'administration de 5 mg/kg d'OTA, en dose intrapéritonéale unique, à des souris gravides, conduit à des malformations foetales, voire à la mort *in utero*. Les effets les plus fréquents sont l'encéphalite et certaines anomalies observées au niveau des yeux, des doigts et de la queue (Hayes *et al*, 1974). Une étude plus récente a mis en évidence que l'OTA altère un certain nombre de paramètres associés à la croissance et à la différenciation cellulaire embryonnaire chez le rat et la souris (Mayura *et al*, 1986). Il a été aussi démontré que l'OTA peut traverser le placenta et s'accumuler dans les tissus foetaux chez la rate gravide (Ballinger *et al*, 1986).

Le mécanisme de la tératogénicité induite par l'OTA n'a pas été clairement défini mais il semble lié à un effet sur la synthèse des protéines. Ceci est confirmé par le fait que la phénylalanine reverse les effets tératogènes de l'OTA et prévient l'inhibition de la synthèse protéique (Mayura *et al*, 1984).

I.3.2.5 Génotoxicité et mutagénicité

Les différents examens servant à évaluer la mutagénicité effectués sur les procaryotes conduisent tous à des résultats négatifs, ou faiblement positifs (Bendele *et al*, 1985b; Pfohl-Leskowicz, 1994a). Ainsi, l'addition de l'OTA n'induit pas d'inhibition de la croissance chez les différentes souches de *Bacillus subtilis* testées (Ueno et Kubota, 1976). De même, aucune recombinaison mitotique n'a été observée chez *Saccharomyces cerevisiae* D3 après traitement des cultures par l'OTA (Kuczuk *et al*, 1978). Cette toxine ne provoque pas de mutation de la résistance à la 8-azaguanine dans les cellules de carcinomes mammaires de souris C3H traitées avec des doses de 5 et 10 µg/ml (Umeda *et al*, 1971). Henning *et al* (1991) ont montré une activité mutagène chez des *Salmonella typhimurium* exposées à de l'OTA métabolisée préalablement par des hépatocytes de rats. Une induction d'échange de chromatides soeurs dans les lymphocytes humains cultivés dans un milieu contenant ces hépatocytes et de l'OTA a été observée dans cette même étude.

L'OTA a longtemps été considérée comme une mycotoxine non-génotoxique, mais les résultats sont plutôt contradictoires. La génotoxicité a été démontrée à l'aide de certains types de cellules de mammifères (De Groene *et al*, 1996). Une altération de la synthèse de l'ADN dans les hépatocytes de rats et de souris en culture, a été montrée par Mori *et al*, 1984. La confirmation de la génotoxicité de l'OTA a été mise en évidence par des études *in vivo*. Des cassures simples-brins ont été observées dans l'ADN de rein, de foie, de rate chez la souris et chez le rat 24 heures après l'administration de l'OTA (Creppy *et*

al, 1985; Kane *et al*, 1986b). Récemment, Manolova *et al* (1990) ont montré des aberrations chromosomiques sur le chromosome X de lymphocytes humains cultivés en présence d'une concentration d'OTA de 15 nM. Cette aberration se retrouve aussi chez les patients souffrant de la néphropathie endémique des Balkans (Castegnaro *et al*, 1987; Petkova-Bocharova *et al*, 1988).

Pfohl-Leszkowicz *et al* (1991; 1993b) ont montré la formation d'adduits de l'ADN par l'OTA et que cet effet était dose dépendant. Après administration d'une dose unique d'OTA, des adduits apparaissent dans le rein après 8 heures, alors qu'ils n'apparaissent qu'au bout de 24 heures dans le foie et dans la rate. Au bout de 16 jours, un nombre important d'adduits persiste encore dans le rein, alors que dans le foie et la rate, la réparation est complète après 5 jours. Les adduits ne sont d'ailleurs pas totalement identiques d'un organe à l'autre et d'une espèce à l'autre, signifiant bien une différence dans les voies de métabolisation. De plus, la biotransformation de l'OTA au niveau du rein ne semble pas conduire à une détoxification totale (Pfohl-Leszkowicz, 1994a). C'est ce qui expliquerait l'effet néphrotoxique et cancérigène de l'OTA au niveau de cet organe. Les systèmes de réparation de l'ADN ne seraient donc pas les mêmes dans tous les organes.

I.4 Toxicité de l'OTA chez l'humain

I.4.1 Néphropathie endémique des Balkans.

La néphropathie endémique des Balkans (NEB) a été décrite pour la première fois en 1956 dans la région de Vratza en Bulgarie (Tanchev *et al*, 1956) et par la suite en Yougoslavie, l'étiologie évoquée alors étant l'intoxication au plomb par la farine (Danilovic *et al*, 1957). La NEB est une néphropathie tubulo-interstitielle chronique familiale, dont le début est insidieux et l'évolution vers l'insuffisance rénale lente. La plupart des sujets atteints parviennent au stade de l'insuffisance rénale terminale au cours de la 5^{ème} ou la 6^{ème} décennie (Godin *et al*, 1997). La région endémique est bien circonscrite, dans les zones rurales de Yougoslavie, Bulgarie et Roumanie, situées le long des affluents du Danube (Stefanovic et Polenakovic, 1991). On estime à 20 000 le nombre de personnes atteintes par la maladie (Barnes *et al*, 1977). C'est une maladie chronique qui touche le plus souvent les sujets de 30 à 50 ans et évolue lentement jusqu'à la mort (OMS, 1980).

La NEB est très souvent associée à des tumeurs du tractus urinaire (Chernozemsky *et al*, 1977; Castegnaro *et al*, 1987; Petkova-Bocharova *et al*, 1988; Radonic *et al*, 1992; Vukelic *et al*, 1992; Mantle et Mc Hugh, 1993). Histologiquement, la lésion rénale est caractérisée par une dégénérescence des tubules contournés, une fibrose du tissu interstitiel et une hyalinisation des glomérules dans la partie la plus superficielle du cortex. La dégradation de la fonction tubulaire caractérisée par le déclin du Tm_{PAH} constitue un signe remarquable et précoce (Dotchev, 1973). Certains signes biologiques ont été rapportés comme une acidose, une amino-acidurie, une glycosurie (Radonic et Radosevic, 1992) ainsi qu'une protéinurie (β_2 -microglobuline) (Jevremovic *et al*, 1991).

Quarante ans après sa découverte, l'étiologie de la NEB commence à être mieux définie (Bozic *et al*, 1995). Les caractéristiques épidémiologiques de la maladie ont conduit à rechercher avec tenacité un facteur environnemental. Plusieurs facteurs ont été suggérés, tels que le plomb, le cadmium, l'infection virale et les facteurs génétiques (Wedeen, 1991). Ce fut le mérite de Krogh d'émettre l'hypothèse que l'agent étiologique de la néphropathie porcine pouvait être également celui de la NEB, tant les deux maladies avaient des points communs au plan clinique et histologique (Krogh, 1977). Trois types d'arguments sont classiquement avancés pour admettre la responsabilité de l'OTA face à l'origine de la néphropathie: d'abord la plus grande fréquence d'une contamination des aliments par l'OTA dans les régions endémiques, puis la plus forte prévalence de sang contaminé chez les habitants de ces régions, et enfin l'association des tumeurs urinaires à cette néphropathie. La néphropathie observée chez ces malades a beaucoup de ressemblance avec celle observée chez le porc suite à une contamination naturelle des aliments par des moisissures productrices d'OTA, ou reproduite expérimentalement chez le porc par ajout de l'OTA pure à la nourriture (Krogh, 1977; Madsen *et al*, 1982; Mortenson *et al*, 1983). Pour toutes ces raisons et après avoir éliminé toutes les autres causes possibles, l'OTA est considérée comme l'agent causal principal de cette maladie. Dès 1980, l'OTA a été associée à la NEB, maladie sévissant dans les zones de cette péninsule des Balkans où la concentration en OTA dans les céréales est très élevée (Plestina *et al*, 1981; Hult *et al*, 1980; Ceovic *et al*, 1992). La maladie est endémique et affecte les femmes plus souvent que les hommes (Hrabar *et al*, 1976; Chernozemsky *et al*, 1977). En Bulgarie et en Yougoslavie, l'incidence élevée des tumeurs de l'appareil urinaire était en corrélation avec les taux de mortalité de la NEB qui a été observée (Ceovic *et al*, 1992; Chernozemsky *et al*, 1977).

Il faut aussi noter que d'autres études menées dans la région ont montré que les personnes atteintes de néphropathie et/ou de tumeurs du tractus urinaire avaient de l'OTA dans le sang (de 2 ng à 40 ng/ml) et des concentrations d'OTA plus élevées dans la nourriture que dans les autres zones (Chernozemsky *et al*, 1977; Plestina *et al*, 1990; Petkova-Bocharova et Castegnaro, 1991). Des études plus récentes ont montré que l'ochratoxicose humaine n'est pas un problème balkanique mais un problème européen voire mondial (Bauer *et al*, 1986; Breitholz *et al*, 1991; Creppy *et al*, 1991; Kuiper-Goodman *et al*, 1993; Maaroufi *et al*, 1995a,b). La présence de l'OTA dans le sang humain a été rapportée dans divers pays à travers le monde (Bauer et Gareis, 1987; Breitholtz *et al*, 1991; Frohlich *et al*, 1991; Creppy *et al*, 1993; Khalef *et al*, 1993; Maaroufi *et al*, 1995a) (Tableau 7). Les résultats montrent l'omniprésence de l'OTA dans le sang humain et à des taux plus élevés, surtout en Europe et en Afrique du Nord. La présence de l'OTA dans le sang humain est considérée comme un indicateur indirect d'une exposition à l'OTA. Elle a été aussi retrouvée dans le lait maternel, ce qui constitue une source d'exposition pour les enfants en bas âge (Gareis *et al*, 1988; Micco *et al*, 1991).

Bien qu'on n'ait pu démontrer le lien direct de cause à effet entre l'OTA dans l'alimentation, dans le sang humain et des cas de néphropathies dans les pays autres que les Balkans, il est toujours possible de montrer que lorsque la prise journalière d'OTA est calculée sur les bases des concentrations trouvées dans les aliments et la ration type d'une population donnée, la concentration plasmatique en OTA reflète les niveaux de contamination des aliments (Kuiper-Goodman et Scott, 1989; Breitholtz *et al*, 1991). Dans une étude effectuée en Tunisie, Maaroufi *et al*, 1995a ont trouvé que, dans la population générale, 65% des sujets ont un taux d'OTA sérique de 0.7-7,8 ng/ml. Par contre chez les patients atteints de néphropathie interstitielle chronique, le taux est de 25-59ng/ml. Ce taux est de 8 à 10 fois supérieur à celui de la population générale. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont rapporté que les patients ayant une

néphropathie interstitielle chronique et les taux d'OTA sériques les plus élevés témoignent également de la contamination alimentaire la plus importante (>200 µg/kg dans la nourriture versus 16 µg/kg chez les témoins) (Maaroufi *et al*, 1995b). Tous ces éléments sont en faveur d'une origine presque exclusivement alimentaire de l'intoxication par l'OTA en Tunisie. Les résultats des différentes études faites dans la région des Balkans et ailleurs suggèrent fortement l'implication très probable de l'OTA dans l'étiologie de la BEN.

Un cas d'intoxication par inhalation a été décrit en Italie où des paysans ont présenté une insuffisance rénale aiguë après avoir respiré des spores d'*Aspergillus ochraceus* dans un grenier resté fermé pendant deux ans (Di Paolo *et al*, 1993). Il n'est donc pas impossible que des personnes puissent être intoxiquées par la manutention de céréales contaminées par des moisissures productrices d'OTA, comme cela a été décrit pour l'aflatoxine B1 chez les dockers (Baxter *et al*, 1981).

Tableau 7 : Présence de l'OTA dans le sang humain et dans le lait maternel

Pays	Source	Année	N°Positif/Total	% positifs	Teneur (ng/ml)
Allemagne	lait		4/36	11	0.017-0.03
Italie	'''	89-90	9/50	18	1.7-6.6
Algérie	sang	-	231/346	67	0.1-9
Allemagne	'''	77-85	173/306	56	0.1-14.4
Bulgarie	'''	84-90	82/576	15	1-35
Canada	'''	88	63/159	40	0.27-35.3
Danemark	'''	86-88	78/144	54	0.1-13.2
France	'''	91-92	97/500	19	0.1-6
Pologne	'''	83-84	77/1065	13	0.1
Suède	'''	89	38/297	13	0.3-6.7
Tunisie	'''	-	342/442	77	2-100
Yougoslavie	'''	81-89	240/17175	14	5-100

(D'après IARC, 1993)

I.5 Mécanismes biochimiques de l'ochratoxicose

I.5.1 Inhibition de la synthèse des protéines

L'OTA inhibe la synthèse des protéines lors de l'élongation, en empêchant la charge de la phénylalanine sur son tRNA spécifique (Bunge *et al*, 1978; Heller et Roschenthaler, 1978; Creppy *et al*, 1979). Cela entraîne l'inhibition de la synthèse des protéines qui a été documentée dans les cultures de cellules ainsi qu' *in vivo* (Creppy *et al*, 1983; 1984; 1986), et aussi celle des acides nucléiques (Meisner *et al*, 1983).

Ce pouvoir inhibiteur de l'OTA, qui explique en partie les effets toxiques, n'épargne pas non plus certaines enzymes qui interviennent dans sa propre métabolisation. Ainsi, les taux du CYP-450 et ceux de l'aminopyrine déméthylase et l'alanine hydroxylase sont abaissés par l'OTA (1,5 mg/kg pendant 15 jours), alors que les enzymes de la phase II du métabolisme des xénobiotiques ne sont pas affectées (Galtier *et al*, 1984).

D'autres études ont montré que l'OTA est un inhibiteur de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) rénale, enzyme clé de la néoglucogénèse, chez le rat et chez la truie (Meisner et Meisner, 1981; Meisner et Krogh, 1982). Ainsi, chez les rats ayant reçu de l'OTA (0.3- 5 mg/kg PC) pendant 2 jours, l'activité de la PEPCK est réduite de 50% ce qui se traduit par une diminution de la néoglucogénèse rénale. L'activité de la PEPCK hépatique n'est pas affectée par l'OTA à des doses de 1.5-2 mg (Meisner et Selanik, 1979).

Creppy *et al* (1986) ont étudié l'effet de l'OTA sur la synthèse *in vitro* des macromolécules par des cellules rénales en présence et en absence de la phénylalanine (composé structural de l'OTA). La synthèse de l'ARN et de l'ADN ainsi que l'activité de cinq enzymes sont inhibées par l'OTA, à dose dépendante, après une incubation de 24 heures. La toxicité de l'OTA est prévenue par l'addition de la phénylalanine au milieu d'incubation, tenant compte que la composante phénylalanine de l'OTA est impliquée dans l'effet toxique de l'OTA.

I.5.2 Peroxydation des lipides

En présence de NADPH et du Fe²⁺, l'OTA entraîne des dommages oxydatifs (formation des radicaux libres) en augmentant la peroxydation lipidique (Rahimtula *et al*, 1988; Hasinoff *et al*, 1990; Omar *et al*, 1991 et 1996). Ces dommages pourraient altérer la perméabilité membranaire et le développement des lésions pouvant conduire à des nécroses (Creppy *et al*, 1995a). La production par l'OTA des radicaux libres suite à une lipoperoxydation est généralement contrecarrée par des antioxydants et des capteurs de radicaux libres tels que les vitamines A et E, et la superoxyde dismutase et la catalase (Baudrimont *et al*, 1994; Bose et Sinha, 1994; Grosse *et al*, 1995).

Dans le but de déterminer si la voie oxydative de métabolisation de l'OTA et la formation de radicaux libres est en relation avec sa génotoxicité, Pfohl-Leszkowicz *et al* (1993a, 1994b) ont étudié la formation d'adduits à l'ADN dans les reins et les testicules de la souris, en faisant varier cette voie de métabolisation. L'administration simultanée de superoxyde dismutase et de catalase avant le gavage de l'OTA a provoqué une diminution des adduits totaux dans l'ADN des reins et des testicules de 90% et 30% respectivement. Ces adduits seraient probablement produits par voie oxydative.

Les autres voies oxydatives impliquées dans le métabolisme de l'OTA sont en relation avec la co-oxydation durant la synthèse des prostaglandines. Cette voie a été bien explorée par Pfohl-Leszkowicz *et al*, (1994b). Les auteurs ont prétraité des souris avec de l'aspirine ou de l'indométhacine avant l'administration de l'OTA. Ces deux substances inhibent la prostaglandine synthétase (PHS) (enzyme permettant la cooxydation de xénobiotiques lors de la synthèse de prostaglandines). Les résultats ont montré une modification du profil des adduits avec disparition totale de certains adduits, aussi bien dans le rein que dans le foie, ainsi qu'une atténuation dans les autres tissus.

Le prétraitement des animaux avec des vitamines connues pour avoir un pouvoir antioxydant: la vitamine A, la vitamine E et la vitamine C a engendré une diminution de la génotoxicité qui est attribuée en grande partie à la formation des adduits (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1994a).

1.5.3 Implication de la conjugaison au glutathion

Généralement, la voie de métabolisation par conjugaison avec le glutathion est considérée comme une voie de détoxification (Jakoby et Habig, 1980). Néanmoins, certains dérivés provenant de la conjugaison au glutathion sont des composés électrophiles pouvant être mutagènes et cancérigènes (Dekant et Vamvakas, 1989; Lafleur et Retel, 1993; Vadi *et al*, 1985; Van Bladeren *et al*, 1980). De plus, l'accumulation de conjugués au glutathion peut être néphrotoxique (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1994). La diminution du taux de glutathion rénal provoque la baisse de la formation de conjugués d'OTA. Il faut noter qu'au niveau rénal, les dérivés thiols (métabolites des dérivés conjugués au glutathion) peuvent bloquer l'action de la glutathion peroxydase entraînant ainsi une augmentation de H₂O₂ et par ce fait, la formation de produits radicalaires très réactifs. Cette voie de métabolisation a été mise en évidence par l'utilisation de substances pouvant dépléter le taux de glutathion ou bien l'augmenter. Ainsi, l'administration de phorone à des souris a provoqué la diminution du taux de glutathion de 66% et de 11%, respectivement dans les reins et dans les testicules, après 4 heures. Cette substance administrée avant l'OTA avait réduit le taux d'adduits dans ces tissus. La N-acétylcystéine (NAC) qui abaisse également le taux de glutathion dans ces deux organes avait aussi induit une diminution des adduits dans ces tissus. Par contre, dans le foie où cette substance fait augmenter le taux de glutathion, une élévation considérable du taux d'adduits a été observée. Ces résultats indiquent que le glutathion peut jouer un rôle dans la génotoxicité de l'OTA, soit par la formation de dérivés conjugués génotoxiques, soit par ses propriétés oxydoréductrices (Pfohl-Leszkowicz *et al* , 1993a, 1994a)

I.5.4 Effet sur la respiration cellulaire

Le troisième mécanisme impliqué dans la néphrotoxicité de l'OTA est celui lié à la respiration cellulaire ainsi qu'à la production d'ATP par la mitochondrie (Berndt, 1993; Jung et Endou, 1989). Les études *in vitro* utilisant des mitochondries isolées du foie de rat ont montré que l'OTA bloque la respiration cellulaire en agissant comme un inhibiteur de transporteur des protéines au niveau de la membrane mitochondriale (Meisner et Chu, 1979; Wei *et al*, 1985). Aleo *et al* (1991) ont récemment suggéré que la toxicité induite par l'OTA dans les tubules proximaux rénaux du rat est d'avantage reliée à l'inhibition de la respiration cellulaire qu'à la peroxydation lipidique, modulée par le fer. Ces travaux ont montré que, même en présence d'un chélateur du fer (desferoxamine) pour contrecarrer la peroxydation des lipides, l'OTA a entraîné des dommages au niveau de la mitochondrie. En plus de son effet sur la fonction mitochondriale, l'OTA peut aussi altérer sa morphologie (Suzuki *et al*, 1975).

I.6 Stabilité de l'OTA au cours des transformations technologiques des aliments

L'OTA est une molécule très stable et elle n'est pas détruite par presque la plupart des transformations technologiques (Scott, 1984; 1991; 1996a; Scumadore, 1996). La toxine n'est pas totalement éliminée des grains de céréales durant le processus de lavage et de mouture (Scott, 1984; Osborne *et al*, 1996). L'OTA est aussi résistante aux traitements thermiques : Studer-Rohr *et al* (1995) ont montré que la torréfaction des grains de café (252°C pendant 2 à 3 min) ne permet pas de détruire totalement l'OTA. La stabilité de l'OTA durant la cuisson a été aussi rapportée (El Banna et Scott, 1984; Milanez et Leitao,

1996). La présence de l'OTA dans le pain et dans les biscuits (Scott, 1984; Scott, 1991) a aussi été signalée. Il faut noter que l'OTA a été détectée dans la bière, ainsi, les processus de brassage, de fermentation et de pasteurisation ne permettent pas de diminuer l'OTA (taux de contamination $>0.3\mu\text{g/l}$) (Scott, 1996b). Zimmerli et Dick (1996) ont rapporté que l'OTA peut se retrouver dans le vin de table ainsi que dans le jus de raisin, les concentrations trouvées sont de 79 pg/ml et de 235 pg/ml respectivement.

II. Évaluation du risque pour la santé

Les enquêtes menées au Canada et dans d'autres pays dans le cadre d'un programme de surveillance de la contamination des aliments par l'OTA ont montré l'omniprésence de l'OTA à des taux variables (Speijers et Van Egmond, 1993). La présence d'OTA dans les aliments constitue-t-elle un problème de santé aussi bien pour l'homme que pour l'animal? Ceci peut être déterminé par l'évaluation des risques associés à la présence d'OTA dans les aliments.

En effet, l'évaluation des risques nous donne une idée sur la signification de l'exposition humaine à l'OTA en termes de toxicité.

L'évaluation des risques comporte deux composantes, l'évaluation du danger et l'évaluation de l'exposition.

II.1 Évaluation du danger "Hazard assessment"

L'évaluation du danger permet de déterminer les quantités qui peuvent se retrouver dans les aliments sans risquer de porter atteinte à la santé du consommateur (Frisvad et Samson, 1991). Elle est exprimée par le TDI "Tolerable Daily Intake" ou la consommation journalière acceptable ou la dose sécuritaire, qui correspond à la dose maximale pouvant être consommée quotidiennement par l'homme, pendant sa vie entière, sans effet nocif (Kuiper-

Goodman, 1991a,b; Kuiper-Goodman *et al*, 1993). Le TDI sert aussi de base de calcul pour établir les normes de tolérance des produits toxiques dans les aliments.

Pour établir la dose de sécurité (TDI) deux approches sont envisageables (Kuiper-Goodman *et al*, 1993; Kuiper-Goodman, 1994).

- L'approche quantitative, déterminée à partir du NOEL divisé par un facteur de sécurité. La NOEL "No Observed Effect Level" qui est la dose maximale à laquelle on n'observe pas d'effet a été évaluée à 21 µg/kg PC/jour (rat mâle). Le facteur de sécurité (FS) est introduit pour tenir compte des variations de la sensibilité à la mycotoxine d'une espèce à l'autre et entre les individus d'une même espèce (Kuiper-Goodman *et al*, 1993; Kuiper-Goodman, 1991a,b; 1994). Le FS varie de 100-1000 pour les effets non cancérogènes et de 1000-5000 pour les effets cancérogènes.

Dans la détermination de TDI pour l'OTA, un facteur de sécurité de 5000 a été retenu.

TDI= NOEL/5000= 21/5000= 4.2 ng/kg/j (Kuiper-Goodman *et al*, 1993; Kuiper-Goodman, 1991; 1994)

- L'autre approche consiste à utiliser le TD50 qui est la dose à partir de laquelle 50% des animaux pourraient développer un cancer, elle a été estimée à 74µg/kg PC/j (rat mâle). C'est une estimation numérique du potentiel cancérogène de la toxine. En effet, le TD50 se situe dans la région des réponses observées de la courbe dose-réponse et pourrait être plus valide (Kuiper-Goodman, 1991a,b; Kuiper-Goodman *et al*, 1993). Dans ce cas un facteur de sécurité de 50000 a été proposé puisqu'il n'y a pas beaucoup de différence entre l'utilisation d'un facteur de 50000 ou l'extrapolation linéaire de TD50 (risque 0.5) à un risque de 10ⁿ (n=-5) (Kuiper-Goodman *et al*, 1993; Kuiper-Goodman, 1991 a et b; 1994).

TDI= TD50/50000= 74/50000= 1.5ng/kg PC/j

Dans l'évaluation du danger, les deux approches sont utilisées pour déterminer la valeur supérieure et inférieure de la dose journalière tolérable. Un **TDI de 1.5-4.2 ng/kg PC/j** a été proposé (Kuiper-Goodman *et al*, 1993; Kuiper-Goodman, 1991a,b; 1994).

Le comité d'experts mixte OMS/FAO en 1991 a établi un apport journalier tolérable (OMS, 1991; Herrman, 1991). Cette valeur a été déterminée à partir d'une étude faite sur le porc, étant donné qu'il n'a pas été possible de définir une NOEL et que l'observation n'a porté que sur une fraction de la vie du porc (90 jours). Le comité a décidé d'appliquer une marge de sécurité de 500 à la dose correspondante à l'effet minimal observé (LOEL), soit de 8µg/kg PC/j. En se basant sur cette étude, une dose hebdomadaire tolérable provisoire a été établie à 112 ng/kg PC soit **16 ng/kg/j**. Il faut noter que dans l'estimation de OMS/FAO, il n'a été tenu compte que de l'effet néphrotoxique et non de l'effet cancérigène de l'OTA comme l'a montré le cas d'estimation suggérée par Kuiper-Goodman et coll.

II.2 Évaluation de l'exposition

L'exposition de l'humain à l'OTA est très fréquente, si l'on se fie aux différentes enquêtes portant sur la surveillance de la contamination des aliments menées dans le monde (Speijers et Van Egmond, 1993). L'exposition est déterminée à partir de la concentration de l'OTA dans les fluides humains ou animaux (sang et lait) et dans les tissus des animaux qui reflètent une exposition récente et chronique. Les données de ces analyses permettent d'identifier les populations à risque. Cependant, ces valeurs ne nous renseignent pas sur les quantités consommées par la population. À cet égard, Breitholz *et al* (1991) ont proposé un modèle pharmacocinétique, qui lie la consommation continue en OTA à sa concentration, son élimination plasmatique ainsi qu'à sa biodisponibilité. En

se basant sur ces paramètres, ils ont trouvé que la consommation journalière (exprimée en ng/kg PC) est de 40% supérieure à la concentration plasmatique humaine (exprimée en ng/ml). L'exposition est aussi évaluée à partir de la teneur de l'OTA dans les différents aliments combinée au niveau de consommation. Ce dernier est estimé par les enquêtes alimentaires dont les plus utilisées sont le rappel de 24 heures et le journal alimentaire. Les valeurs sont exprimées par g/j selon le sexe, l'âge et l'état physiologique (grossesse, allaitement).

L'étape finale consiste à estimer la consommation journalière probable (PDI) "Probable Daily Intake" exprimée en ng/kg PC/j. Elle est la combinaison des estimations de la consommation avec celles des teneurs en OTA trouvées ou estimées être présentes dans les aliments (d'origine animale).

Plusieurs enquêtes ont été menées dans divers pays dans le but d'estimer l'exposition de l'homme à l'OTA. Ainsi en Tunisie, en Algérie, en République Tchèque et au Canada, le PDI a été calculé en se basant sur la concentration plasmatique. Les résultats trouvés sont de 4.7-130 ng/kg PC/j en Tunisie, 3.8-80.4 ng/kg PC/j en Algérie, 0.74 ng/kg PC/j en République Tchèque et 1.7 ng/kg PC/j au Canada (Maaroufi *et al*, 1995a; Khalef *et al*, 1993; Ruprich et Ostry, 1993; Kuiper-Goodman *et al*, 1993). Les valeurs trouvées en Tunisie et en Algérie sont nettement supérieures au TDI. Dans une autre étude faite au Danemark, Jørgensen *et al* (1996) ont trouvé un PDI inférieur à 5 ng/kg PC/j estimé à partir de la concentration en OTA dans les céréales. Cette valeur est à la limite de la norme établie dans les pays scandinaves.

II.3 Législation et réglementation

Lorsqu'une mycotoxine a été découverte, étudiée sur le plan chimique et bien identifiée dans l'alimentation ou dans l'environnement, les progrès vers une bonne prévention et une législation adaptée dépendent à la fois des résultats expérimentaux obtenus chez l'animal, des effets possibles chez l'homme lorsqu'il

y est exposé et de l'impact de tous ces travaux dans la vie économique et sociale sur le plan international (Creppy et al, 1995b). En 1990, seulement 11 pays (dont 9 pays européens) avaient établi des normes pour le contrôle de la teneur de l'OTA dans les aliments avec des taux très variables allant de 1 à 50 µg/kg pour l'alimentation humaine et de 100-1000 µg/kg pour l'alimentation animale (Van Egmond, 1991; IARC, 1993). Il faut mentionner que la surveillance des concentrations de l'OTA dans les viandes et les abats destinés à la consommation humaine est rarement faite.

III. Conclusion

La contamination des denrées alimentaires par l'OTA se fait essentiellement au cours de leur stockage (Miller, 1995). Comme la contamination par les moisissures est une étape inévitable, il est primordial de développer des mesures pour bien contrôler la contamination des aliments et par ce fait, la diminuer à des niveaux jugés inoffensifs pour l'homme. Une des préoccupations majeures des pays et des instances internationales est de produire et de commercialiser des aliments les plus sains possibles afin de préserver la santé humaine.

Il n'est malheureusement pas possible d'influencer les facteurs climatiques qui prévalent lors de la culture des denrées alimentaires. Certains essais pour rendre les semences plus résistantes aux attaques des moisissures productrices de mycotoxines ont été efficaces, mais ceci est encore très loin de pouvoir être mis en pratique.

Plusieurs publications ont été consacrées aux méthodes de prévention de la contamination vu son importance et ses conséquences sur la santé et sur l'économie (Scott, 1991; 1996; Castegnaro, 1995).

Les méthodes de décontamination utilisées incluent les traitements physiques, chimiques et biologiques. Les méthodes proposées visent d'une part à diminuer la prolifération des moisissures, d'autre part à inhiber la production de la toxine et enfin influencer son absorption et son transport vers les reins. D'autres méthodes permettent d'augmenter l'élimination de la toxine dans l'urine et dans les fèces et/ou contrecarrer son action toxique.

IV. Moyens de prévention de la toxicité induite par l'OTA

IV.1 Moyens physiques

Les méthodes physiques de prévention visent à empêcher la production de la toxine et/ou de la détruire lorsqu'elle est produite. Ainsi, le traitement thermique ne permet pas de détruire complètement l'OTA. Studer-Rohr *et al* (1995) ont montré que la torréfaction des grains de café (252°C pendant 2 à 3 min) ne permet pas d'éliminer totalement l'OTA et la toxine peut se retrouver dans le breuvage à un taux de 0.4-7.8 µg/kg équivalent grains.

Les effets des radiations sur l'OTA ont été aussi étudiés. Chelack *et al* (1991) ont montré que l'irradiation par les rayons gamma est un moyen efficace pour détruire les spores d'*Aspergillus alutaceus* et par ce fait, la production d'OTA. Dans une autre étude, Deberghes *et al* (1993) ont montré que pour être efficaces, les irradiations doivent être appliquées en doses suffisantes. En effet, une irradiation de 2 à 3 kGy n'arrête pas la prolifération des moisissures dans un milieu liquide et, au contraire, elle augmente fortement la production d'OTA par rapport aux témoins. Par contre, une dose de 4 kGy a pu réduire de 60% la production d'OTA et a permis une élimination totale à 5 kGy.

Le traitement par le froid a été aussi envisagé comme un moyen pour détruire l'OTA. La procédé de congélation-décongélation à -20°C avait entraîné une diminution de la production d'OTA de 10 à 40%. La congélation dans l'azote liquide suivie de la décongélation n'a cependant eu aucun effet sur la production d'OTA (Deberghes *et al*, 1993).

IV.2 Moyens chimiques

Les agents oxydants peuvent dégrader les mycotoxines. Par exemple, l'hypochlorite de sodium a été testé pour dégrader les aflatoxines mais il peut occasionner la formation du dérivé 2,3-dichloro qui est mutagène et probablement cancérigène (Castegnaro *et al*, 1981). L'eau oxygénée a été utilisée pour réduire le taux d'OTA, mais elle demeure sans effet apparent (Fouler *et al*, 1994). Le traitement par les agents alcalins a également fait l'objet de nombreuses recherches, tout particulièrement l'ammoniation. Mais, les résultats, quant à l'efficacité d'un tel traitement, sont contradictoires. Bien que l'OTA n'ait pas été détectée après un traitement d'ammoniation, Madsen *et al* (1980, 1983) ont montré que les animaux ayant reçu la nourriture traitée présentaient toujours les signes de toxicité dues à l'OTA et que la teneur en OTA des reins n'était que peu affectée par rapport aux animaux contrôles alimentés avec une diète non traitée. Ces résultats suggèrent que cette méthode non seulement ne permet pas de réduire efficacement la teneur d'OTA dans les aliments, mais s'avère aussi impraticable. Par contre, Chelkowski *et al* (1981, 1982) ont rapporté que le traitement par l'ammoniaque des grains contaminés réduit la concentration en OTA à des niveaux indétectables. Ils ont montré que les gains de poids sont significativement réduits chez les poulets ayant reçu une nourriture contaminée par l'OTA. Il n'y a pas eu cependant de réduction dans les gains de poids dans le groupe ayant consommé la nourriture contaminée et traitée par l'ammoniaque. Ils ont conclu que l'ammoniation permet de détruire l'OTA ainsi que d'autres

mycotoxines. La contradiction des résultats trouvés dans ces deux études est essentiellement due à la méthode d'analyse (limite de détection de la toxine).

D'autres agents ont été étudiés pour la dégradation des mycotoxines tels que le formaldéhyde, les acides, les bisulfates etc... Ces méthodes se sont avérées impraticables, coûteuses et non sécuritaires pour une utilisation à grande échelle (CAST, 1989).

L'utilisation de la phénylalanine a été proposée pour combattre l'effet toxique de l'OTA, en particulier au niveau de la synthèse des protéines (Creppy *et al* 1983; 1984; Moroi *et al*, 1985). La diminution de la synthèse des protéines est attribuée en partie au groupement phénylalanine de l'OTA. L'addition de la phénylalanine à des cellules en culture contenant de l'OTA prévient l'inhibition de la synthèse des protéines. Par contre, les études *in vivo* n'ont pas donné les résultats escomptés. Ainsi, la supplémentation de la phénylalanine à une diète contaminée par l'OTA semble protéger contre la toxicité induite par l'OTA chez le poussin mais entraîne aussi un déséquilibre dans le rapport des acides aminés qui se traduit par une réduction dans le gain du poids et par une diminution de l'efficacité alimentaire (Rotter *et al*, 1989a; Gibson *et al*, 1990; Bailey *et al*, 1990). Ceci est dû au fait que, pour être efficace, la phénylalanine doit être ajoutée à une concentration déjà très élevée.

D'autres procédés ont été utilisés pour diminuer les effets toxiques de l'OTA en relation avec la peroxydation des lipides et aussi la génotoxicité qui consiste en l'addition des vitamines antioxydantes: vitamine C, A et α -tocophérol (Bose et Sinha, 1994; Kumari et Sinha, 1994; Grosse *et al*, 1995). Le traitement par les vitamines semble un moyen efficace pour réduire la toxicité induite par l'OTA mais pose surtout des problèmes d'utilisation comme un moyen prophylactique et de coûts.

Plusieurs autres composés ont été utilisés afin de prévenir les effets toxiques de l'OTA. Dans cette optique, l'utilisation de composés ayant la même structure chimique que l'OTA a été envisagée comme moyen de prévention de la néphrotoxicité. Parmi les composés testés, on peut citer le piroxicam et l'aspartame. Le piroxicam est un médicament dont la structure est analogue à celle de l'OTA. C'est un anti-inflammatoire non stéroïdique qui a la propriété d'être un puissant inhibiteur de la synthèse des prostaglandines. Les travaux de Baudrimont *et al* (1995) ont porté sur l'utilisation du piroxicam pour prévenir la néphrotoxicité chez le rat. Son action réside dans le fait que le piroxicam augmenterait l'absorption gastrique de l'OTA tout en réduisant sa distribution vers les organes. Chez les animaux ayant reçu le piroxicam en même temps que l'OTA, la concentration plasmatique en OTA est très élevée par rapport aux témoins, et l'élimination de la toxine dans l'urine est augmentée de 110% en 24 heures. Le traitement des rats avec du piroxicam a aussi diminué la néphrotoxicité évaluée par les enzymes urinaires (γ GT et NAG) ainsi que les taux de créatinine urinaire et sanguine. Toutefois, l'utilisation du piroxicam comme moyen prophylactique est à éviter puisqu'il est lui-même néphrotoxique à long terme.

L'aspartame (A19) est un méthyle ester de l'aspartyl phénylalanine. Administré à des rats en même temps que l'OTA, il a complètement prévenu la néphrotoxicité et la génotoxicité de l'OTA (Creppy *et al*, 1995a). La concentration de l'OTA dans le plasma et dans les reins était diminuée chez les rats recevant un traitement par l'aspartame. Lorsqu'il est administré après une intoxication par l'OTA, il permet d'épurer efficacement l'OTA de l'organisme (Creppy *et al*, 1996). Les mécanismes impliqués consistent à contrecarrer l'inhibition de la synthèse des protéines provoquée par l'OTA puisque le A19 se sépare en aspartate et en phénylalanine. Il rentre en compétition avec l'OTA sur son site de transport (l'albumine plasmatique) et augmente ainsi son élimination.

Dans l'objectif de renverser son potentiel génotoxique via la peroxydation des lipides et la formation d'adduits d'ADN, l'utilisation des enzymes (superoxyde dismutase + catalase) détoxifiant les radicaux libres a été envisagée (Baudrimont *et al*, 1994). Les résultats obtenus montrent que ces enzymes préviennent en grande partie la néphrotoxicité induite par l'OTA (enzymurie, protéinurie, créatinémie) et favorise l'élimination urinaire de la toxine. L'action de l'OTA au niveau des cellules tubulaires rénales est reliée au phénomène de la peroxydation lipidique dont la conséquence est la diminution de la fluidité membranaire qui entrave ainsi l'excrétion tubulaire de la toxine. La superoxyde dismutase et la catalase agiraient, probablement, en inhibant le processus de peroxydation des lipides, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter l'excrétion de l'OTA. L'utilisation de ces traitements enzymatiques est cependant limitée en raison de leur mode d'administration (par voie sous-cutanée) qui peut constituer un obstacle pratique quant à l'utilisation prophylactique et quant aux coûts qui peuvent être engendrés.

Une autre approche reposant sur l'utilisation des substances adsorbantes telles que le charbon activé, l'aluminosilicate et la cholestyramine a été testée dans le but de diminuer l'absorption de l'OTA (Ramos *et al*, 1996a).

Le charbon activé est une poudre non soluble obtenue après pyrolyse des matières organiques. Ce composé est un puissant adsorbant des médicaments et des substances toxiques. Son action réside dans le fait qu'il prévient l'absorption gastrointestinale des xénobiotiques et qu'il augmente leur excrétion fécale. Il a été aussi utilisé comme antidote lors des empoisonnements par diverses substances chimiques (Hayden et Comstock, 1975). Plusieurs études ont rapporté l'efficacité du charbon activé à prévenir l'absorption de certaines mycotoxines (aflatoxine, patuline, toxine T₂) (Decker et Corby, 1980; Hatch et al, 1982; Ademoyero et Dalvi, 1983; Galey et al, 1987; Poppenga et al, 1987). Pour ce qui est de l'OTA, son utilisation s'est avérée inefficace. Rotter *et al* (1989b) ont montré que l'ajout du charbon activé à une diète contaminée par l'OTA ne diminue

pas la toxicité chez les poussins Leghorn. Cette supplémentation apparaît comme une méthode non pratique pour diminuer la toxicité de l'OTA dans l'élevage de poulets puisqu'ils sont en perpétuelle contamination. De plus, le charbon actif change la couleur de la diète, ce qui diminue aussi son acceptabilité par les poulets.

L'utilisation efficace des aluminosilicates pour prévenir l'absorption des mycotoxines, en particulier l'aflatoxine, a été bien démontrée (Davidson *et al*, 1987; Phillips *et al*, 1990; Ramos et Hernandez, 1997). Son utilisation pour prévenir l'absorption de l'OTA n'a cependant pas donné les résultats escomptés (Huff *et al*, 1992).

Dans cette même optique, l'utilisation de la cholestyramine (CHA), une résine échangeuse d'ions, a été testée. Les résultats obtenus sont très prometteurs. Ainsi, Madhyastha *et al* (1992b) ont rapporté que l'addition de la CHA à une diète contaminée par l'OTA permet de diminuer la toxicité induite par cette dernière chez le rat.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui consiste à étudier l'efficacité de la CHA à diminuer la toxicité induite par l'OTA.

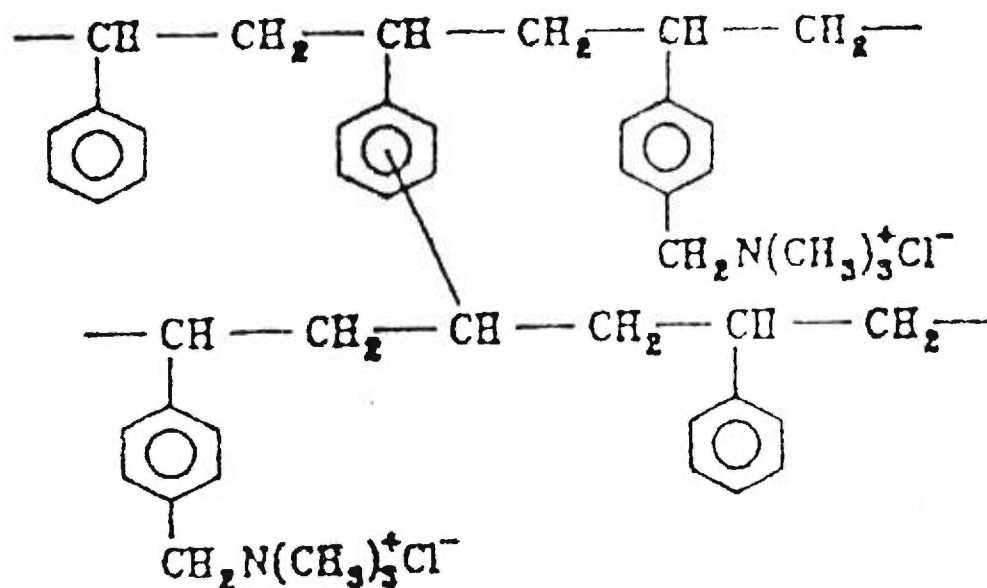
- 1ère partie: Déterminer la dose de la CHA minimale et efficace.
- 2ème partie: Étudier les mécanismes impliqués dans la diminution et / ou la prévention de la toxicité.

V.Prévention de l'ochratoxigose A par la cholestyramine, une résine liant les acides biliaires

V.1 Structure chimique

La cholestyramine (CHA) est une résine échangeuse d'ions qui lie les acides biliaires. C'est un copolymère formé par une molécule de styrène et de divinylbenzène avec un ammonium quaternaire comme groupement fonctionnel (Thompson, 1970; Zhu *et al*, 1992) (Fig. 3). Son poids moléculaire est de 10^6 . La CHA n'est pas toxique et elle est excrétée dans les fèces puisqu'elle n'est pas absorbée par l'organisme.

Figure.3: Structure chimique de la cholestyramine



(D'après John et Bates, 1969; Zhu *et al*, 1992)

V.2 Utilisation clinique de la CHA

La CHA est utilisée principalement pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Administrée oralement, la CHA lie les acides biliaires (AB) dans le tractus gastrointestinal, interrompant ainsi leur circulation entérohépatique et augmentant leur excrétion fécale (Gordon et Roberts, 1980; Clas, 1991; Polli et Amidon, 1995). Ceci résulte dans une diminution du cholestérol sérique (lipoprotéines) qui est le précurseur majeur des AB. Toute diminution du pool des acides biliaires sera compensée par une augmentation de la synthèse à partir du cholestérol dans le foie.

La CHA agit aussi sur l'absorption du cholestérol endogène et exogène au niveau du jéjunum qui dépendent essentiellement de la présence des AB. En liant les AB, la CHA entrave indirectement l'absorption du cholestérol (Thompson, 1970; Gordon et Roberts, 1980).

La liaison entre la CHA et les acides biliaires est de type électrostatique (entre les charges négatives du groupement carboxylique des AB et les charges positives du groupement ammonium de la CHA) renforcée par une liaison hydrophobique (John et Bates, 1969; Zhu *et al*, 1992).

En plus de son efficacité dans le traitement de l'hypercholestérolémie, la CHA s'avère utile à lier certaines substances xénobiotiques (médicaments, poisons et toxines) et elle interfère au niveau de leur absorption (Gallo *et al*, 1965; Kassner *et al*, 1993; Underhill *et al*, 1995; Ramos *et al*, 1996a). Ainsi, cette résine a été utilisée pour traiter l'empoisonnement causé par le lindane. Kassner *et al* (1993) ont comparé l'efficacité de la CHA à prévenir l'effet toxique dû à l'ingestion du lindane avec celle du charbon activé chez la souris. Les résultats obtenus montrent qu'à dose égale (2.25 g/kg), la CHA est plus efficace à prévenir l'apparition des convulsions et la léthalité que le charbon activé.

L'utilisation de la CHA pour la prévention de la toxicité induite par les toxines a été aussi étudiée. Saral et Spratt (1967) ont montré que la CHA diminue significativement la toxicité induite par la digitoxine chez la souris. Le mécanisme impliqué serait dû à l'interruption de la circulation entérohépatique de la toxine. Dans une autre étude, Mullan *et al* (1979) ont utilisé la CHA pour lier l'entérotoxine d'*Echerichia coli*. *In vitro*, la CHA adsorbe 98 % de l'entérotoxine alors que ce taux n'est que de 33% et de 18% pour la bentonite et la cellulose respectivement. Malgré son efficacité *in vitro* à lier l'entérotoxine, la CHA n'a pas prévenu la diarrhée d'origine infectieuse chez les porcelets. Par contre Berant *et al* (1976) ont rapporté que la CHA est efficace à diminuer les épisodes de diarrhées d'origine infectieuse chez les enfants. Ces dernières cessent après 1 à 3 jours de traitement.

La CHA s'est aussi montrée efficace pour prévenir les effets toxiques de la zéaralénone (mycotoxine oestrogénique sécrétée par le genre *Fusarium*) (Underhill *et al*, 1995; Ramos *et al*, 1996b). Les travaux d'Underhill *et al* (1995) ont montré que l'addition de la CHA à une dose de 2.5g/kg permettait de diminuer la toxicité induite par la zéaralénone (6mg/kg de diète) chez la souris, toxicité évaluée par le gain de poids et par le poids relatif de l'utérus. Ramos *et al* (1996b) ont étudié l'efficacité de la CHA à lier la zéaralénone *in vitro* par comparaison avec d'autres adsorbants. Les résultats indiquent que la CHA a plus d'affinité et de capacité à lier la zéaralénone que les autres adsorbants testés (bentonite, trisilicate, crospovidone, montmorillonite).

L'utilisation de la CHA dans le traitement des intoxications dues aux mycotoxines et à d'autres substances toxiques s'est révélée très prometteuse considérant les résultats obtenus.

VI. OBJECTIF GÉNÉRAL DE L'ÉTUDE

Cette étude vise à examiner l'efficacité de la cholestyramine à prévenir la toxicité induite par l'ochratoxine A chez le rat.

VII. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

- La cholestyramine pourrait lier l'ochratoxine A dans le tractus gastro-intestinal, inhiber son absorption, augmenter son excrétion fécale et par ce fait, diminuer sa toxicité.
- La CHA pourrait agir indirectement via une influence sur le pool des acides biliaires. Il est bien établi que la CHA lie les AB, ce qui pourrait diminuer l'absorption de la toxine.

VIII. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

VIII.1 ÉTUDE *IN VIVO*

- Déterminer la dose minimale efficace qui permet de prévenir et/ou de diminuer la toxicité de l'OTA.
- Étudier le mécanisme impliqué dans cette prévention et ou/de cette diminution.
- Étudier le rôle des acides biliaires dans l'absorption de la toxine.

VIII.2 ÉTUDE *IN VITRO*

- Déterminer la capacité et la nature de la liaison et ou/de l'adsorption de l'OTA par la CHA.
- Étudier l'interaction entre OTA-AB sur les sites d'absorption de la CHA.

Chapitre 2: Article I

Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels, and enhancing fecal excretion of the toxin.

Abdelhamid Kerkadi, Claude Barriault, Andrzej A. Frohlich, Ronald R. Marquardt, Guylaine Bouchard, Ibrahim M. Yousef and Beatriz Tuchweber.

Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 52: 231-250, 1998

Avant- propos 1

Cet article décrit les effets de la cholestyramine (CHA), une résine liant les acides biliaires, à diminuer la toxicité induite par l'ochratoxine A (OTA) chez le rat. Pour ce faire, nous avons mesuré le taux d'OTA et de ses métabolites (Ota et HO-OTA) dans le plasma, la bile, l'urine et dans les fèces. Nous avons aussi étudié les effets de l'OTA au niveau du rein et la protection par la CHA. Pour cela, nous avons mesuré l'activité de deux enzymes (γ GT et NAG), la créatinine urinaire, ainsi que des études histologiques sur des échantillons de rein.

Dans cette étude, les rats étaient soumis pendant 14 jours à des diètes contaminées par 1 et 3 ppm d'OTA. A chaque niveau de contamination, les diètes étaient supplémentées avec de la CHA (0.1; 1 et 5%). Le poids corporel et l'ingestion alimentaire étaient relevés chaque jour. Les prélèvements de sang ont été effectués aux jours 7, 10 et 14. La collecte d'urine, de fèces se faisait quotidiennement. Au jour 14, la bile a été collectée et un échantillon de rein a été prélevé pour l'examen histologique.

Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin.

Abdelhamid Kerkadi, Claude Barriault, Beatriz Tuchweber.

Département de Nutrition, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Andrzej A. Frohlich, Ronald R. Marquardt

Department of Animal Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada R3T 2N2.

Guylaine Bouchard, Ibrahim M. Yousef.

Département de Pharmacologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Corresponding author: Dr. Beatriz Tuchweber
Département de Nutrition
Université de Montréal
C.P. 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7

Telephone: (514) 343-6393

FAX: (514) 343-6103

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin that may contaminate animal feed (oat, barley and rye) and food (wheat, rice, coffee, beer, pig meat), leading to major health problems (eg. nephropathy) in several animal species including humans. Several methods have been tested to reduce the toxicity of OTA in animals but with limited success. In rats, the effect of cholestyramine (CHA), a bile acid-binding resin, was investigated on OTA-induced nephrotoxicity and bioavailability. Animals were fed semi-synthetic diets containing two levels of OTA: 1 or 3 ppm. At each level of OTA, the diets were enriched with 0.1, 1 and 5% of CHA. The results showed that CHA decreased the concentration of OTA in plasma. At 1 and 3 ppm of OTA in the diet, CHA is effective at a level of 0.1% and 5% respectively. The excretion of OTA and its metabolites (ochratoxin alpha and hydroxylated ochratoxin A) in bile and urine was also decreased by addition of 5% CHA in the diet. This was associated with an increase of OTA excretion in feces. Enzymuria and renal morphology revealed that dietary CHA can decrease OTA-induced nephrotoxicity, probably by reducing renal exposure to the toxin. In conclusion, CHA can reduce OTA concentrations in plasma as well as reducing nephrotoxicity, which may be attributed to a decrease of bioavailability and/or enterohepatic circulation of the toxin.

INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by fungi such as *Penicillium Verrucosum* (Frisvad and Samson, 1991) and *Aspergillus Ochraceus* (De Scott, 1965; Frisvad and Samson, 1991). OTA may be contained in various grains, cereals, animal feeds, meats, and be found in blood of animals and humans after consumption of contaminated food (Krogh, 1987; Petkova-Bocharova *et al*, 1988; Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Creppy *et al*, 1991; Maaroufi *et al.*, 1995; Marquardt *et al*, 1990). OTA can induce nephrotoxicity in various animal species (Krogh *et al*, 1974; 1979; Kuiper-Goodman and Scott, 1989), and is possibly involved in the Balkan endemic nephropathy in humans (Krogh, 1987). It has also been shown that OTA is an immunosuppressor (Creppy *et al*, 1983; Lea *et al*, 1989), a teratogen (Mayura *et al.*, 1984), a genotoxin (Pfohl-Leszkowicz *et al*, 1991; Creppy *et al*, 1985) and a carcinogen (Kanisawa and Suzuki, 1978; National Toxicology Program, 1989).

OTA is of concern because there is a high potential for its production in stored foods and animal feeds under appropriate temperature and moisture conditions. The public health implications of food contamination with OTA and the difficulties in controlling toxicogenic moisture require the development of means for its rapid elimination from the body and for reduction of its absorption, and, in time, of its toxic effects (Baudrimont *et al.*, 1995). Several methods have been tested including extraction, heat treatment (Josefsson and Moller, 1980), ammoniation (Chelkowski *et al*, 1981), ensiling (Rotter *et al*, 1990), increasing the dietary protein or phenylalanine intake (Bailey *et al*, 1989; 1990; Rotter *et al*, 1989a). Non specific adsorbants, such as charcoal, has also been tested (Rotter *et al*, 1989b). Although some of these methods have shown promise, most have only a minor effect on the tolerance to, or the disposition of, OTA in animals (Marquardt and Frohlich, 1992).

Recent studies have indicated that cholestyramine (CHA), an ion-exchange resin with strong affinity for bile salts (Kos *et al*, 1991), can decrease plasma concentration of OTA and increase its fecal excretion in the rat (Madhyastha *et al*, 1992).

The aim of this study was to determine if dietary CHA can prevent OTA-induced nephrotoxicity, and whether such an effect is related to lower bioavailability of the toxin.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Quebec, Canada) weighing 170-180 g were randomly divided into 13 groups of 6 animals each and placed individually in metabolic cages. Animals were maintained under constant temperature (22°C) and lighting (7 pm to 7 am darkness) with free access to a semi-synthetic diet (AIN-76A) and water *ad libitum*.

Treatment

Ochratoxin and 4-R-hydroxyl ochratoxin were produced using solid phase fermentation of wheat inoculated with *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 followed by extraction and purification as described by Xiao et al, (1995, 1996). Ochratoxin α was synthesized by acid hydrolysis of OTA according to van der Merwe et al, (1965). The compounds were shown to be analytically pure as determined from high performance liquid chromatography (HPLC) analysis using fluorescence and photodiode array ultraviolet detection, melting points, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry. CHA was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). The semi-synthetic diets contained two levels of OTA: 1 or 3 ppm (mg/kg). A first series of experiments was conducted with animals fed diets supplemented with 0.1, 1 and 5% of CHA (the quantity of CHA replaced the same amount of sucrose in the diets). To determine the minimum effective CHA concentrations, a second series of experiments have been carried out. At a level of 1 ppm of OTA, diets were supplemented with 0.025 and 0.06% of CHA. At 3 ppm of OTA, diets were supplemented with 2.5 and 3.5% of the resin.

After an acclimatization of 3 days to the control diet (basal diet without OTA or CHA), rats were fed experimental diets containing OTA alone, CHA alone or OTA plus CHA in different concentrations for a period of 14 d.

Under ether anesthesia, blood samples were collected from the retro-orbital sinus on d 2, 7, 10 and 14 to determine OTA concentration in plasma. Urine and feces were collected daily from day 7 to 14. After measurement of urine volume and feces weight, samples were frozen and stored at -20°C pending analysis of OTA and its metabolites: ochratoxin alpha ($\text{OT}\alpha$) and hydroxylated ochratoxin A (HO-OTA).

On d 14, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (55 mg/kg bw, ip), and the common bile duct was cannulated with a PE-10 catheter. Bile was collected on ice in pre-weighed tubes during 1 h at 15 min intervals. Body temperature was maintained throughout at $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, using a rectal probe and thermostatically-controlled heat lamp. Bile volume was determined gravimetrically, assuming a density of 1 g/ml.

The rats were sacrificed by exsanguination via the abdominal aorta and pieces of liver and right kidney were fixed for further histological examination.

Analytical methods

OTA and its metabolites ($\text{OT}\alpha$, HO-OTA) were determined on d 2, 7, 10 and 14 in plasma, urine and feces and in bile only on d 14. The same extraction procedure (Hult et al, 1979) was used to measure OTA and its metabolites in the diets, blood, serum and feces. One hundred microlitres of serum was used for extraction. Fecal samples were dried/lyophilized for 48 hours prior to extraction. One gram of feces was homogenized with 10 ml of HCL: MgCl_2 solution (as in the case of serum), its pH was adjusted to 2.3 with 6N HCl, and then extracted with 6 ml of chloroform. Bile and urine samples were mixed 1:4 methanol,

centrifuged at 14000xg for 15 minutes and injected directly into the C18 column. The HPLC analyses were performed according to Frohlich *et al*, (1997) using a gradient mobile phase which consisted of double distilled water adjusted to pH= 2.1 with H₃PO₄ (solvent A) and methanol containing 10% isopropanol (solvent B) at a flow rate of 1.5 ml/min and a temperature of 40°C. The amount of solvent B in the mobile phase was increased linearly from 30 to 48% in the first 10 minutes of the run, kept constant at 48% for 6 minutes and increased to 70% over 9 minutes. During this time period all detectables compounds were eluted.

The column was washed with 90% of solvent B for 6 minutes and further equilibrated with 30% of solvent B for 10 minutes. Ten microlitres aliquots of samples were injected using an automatic injector Waters WISP 712. The HPLC system consisted of LKB pump 2150, controller 2152, and column oven 2155.

Ochratoxin A and its metabolites were detected with a Shimadzu RF 545 fluorescence detector set at 333 nm for excitation and at 450 nm for emission.

Pure ochratoxin A and 4-R-hydroxyl ochratoxin A were prepared as described by Xiao *et al*, (1995, 1996). Ochratoxin α was prepared according to van der Merwe (1965). Fecal, blood, urine and bile samples from non OTA treated animals that were extracted as described above did not have peaks that coeluted with OTA, OT α or HO-OTA. Hydrolysis of OTA to OT α and hydroxyl OTA to its hydroxylated isocoumarin moiety yields peaks which coeluted with the corresponding standards. Studies with the diets, blood, urine, bile and feces when spiked with OTA, OT α and HO-OTA yielded recoveries of from 95 to 105%.

Biochemical assays

Several assays were used to evaluate the potential protective effect of cholestyramine on renal damage induced by OTA. To evaluate nephrotoxicity, enzymuria, creatinine and glucose were determined in urine. Gamma-glutamyl

transferase (γ GT, EC 2.3.2.2) activity was assessed by a modification of the methods of Szasz (1969) and Dierickx (1981). N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG, EC 3.2.1.30) was determined by the method of Horak *et al*, (1981). Glucose and creatinine in urine were determined using Sigma kits No. 115-A and 555-A, respectively. Total bile acids in bile and in feces were assessed with 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase according to the method of Weber *et al*, (1972). For evaluation of possible liver damage, serum alanine aminotransferase (ALT, EC 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (AST, EC 2.6.1.1) activities were assessed using the Sigma kit No. 505-OP. The triglyceride content of livers was determined using a Boehringer Mannheim kit (GPO-PAP, No. 701882, Montreal, Quebec, Canada) following lipids extraction.

Histopathology

Sections of renal and hepatic tissue were collected for light microscopy. Kidney and liver tissue were fixed in alcohol-formol solution (20 ml of 10% formalin buffered solution, 80 ml anhydrous ethanol), and paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin-phloxine.

Statistics

The data were evaluated by one way analysis of variance (ANOVA) and when values were found to be significant, comparisons between groups were made using Duncan's test. All results are expressed as means \pm standard error. Differences were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

The addition to the diet of OTA or CHA alone or in combination did not influence food intake, body weight gain, or liver and kidney weight (results not shown). Table 1 presents results of urinary and fecal output. The addition of CHA to the diet did not change the urine output. The feces weight was increased significantly by the addition of 2.5 and 5% CHA, either in groups receiving or not OTA.

Ochratoxin A Concentration in Plasma.

Figure 1 shows the effect of CHA on OTA concentrations in plasma. As expected, animals fed diets containing 3 ppm of OTA exhibited a higher plasma level of the toxin (X2) when compared to animals fed diet containing 1 ppm. At both levels of the mycotoxin, a steady state of plasma concentration of OTA was obtained between d 7 and 10.

When CHA is added to diets containing OTA, a lower plasma level of the toxin is observed. At 1 ppm (1mg/kg) of OTA in the diet, CHA significantly decreased OTA concentrations in plasma at all levels examined. Average of the decreases were 30, 36 and 70% for 0.1, 1 and 5% CHA, respectively, at each time period of study. CHA concentrations lower than 0.1% did not significantly reduce the plasma level of the toxin ($1.6 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ versus $1.23 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$) for the control and 0.06%CHA diets, respectively.

At 3 ppm of OTA in diet, a level of 5% CHA was required to decrease significantly the OTA plasma concentration, and the reduction was about 70% at each time period of observation (Figure 1). In the additional study using CHA concentrations between 1 and 5%, it was shown that at least 2.5% of the resin was necessary to decrease significantly OTA concentration in plasma ($4.1 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ versus $1.6 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$) for the control and CHA 2.5%, respectively.

At 1 and 3 ppm of OTA, the metabolite OT α was detected in plasma but its concentration was low (mean < 0.016 $\mu\text{g/ml}$ for all time periods examined). The addition of CHA did not markedly change the concentration of OT α in plasma (results not shown).

Secretion of OTA and its Metabolites in Bile.

Bile flow was virtually similar in all treated groups (0.95 - 1.22 $\mu\text{l/min/g}$ liver) and did not differ significantly from control groups (without OTA or CHA). Table 2 shows secretion rates of OTA and its metabolites in bile. In the OTA alone-treated groups (given 1 or 3 ppm of OTA), the toxin was mainly secreted as OTA, with low secretion rates of OT α (non toxic metabolite) and HO-OTA (as toxic as OTA). In animals fed diets containing 3 ppm of OTA, the secretion rates of the toxin and its metabolites in bile was more than twice those seen in rats fed 1 ppm OTA.

The secretion rate of OTA in bile of rats fed diets containing 1 ppm of OTA was significantly reduced when diets were supplemented with 1% or 5% CHA. At 3 ppm of OTA, the secretion rates of the mycotoxin and its metabolites (OT α and HO-OTA) in bile were significantly reduced when diets contained 1 and 5% of CHA.

Excretion of OTA and its Metabolites in Urine.

Figure 2 indicates that the urinary secretion rates of OTA and its metabolites were 2.5 times higher in the group fed 3 ppm of the toxin than in the the group fed 1 ppm. For both levels of OTA, the toxin was excreted in the urine mainly as OT α and to a lesser degree as OTA and HO-OTA. It was noted that the level of OT α excreted in urine decreased with time after reaching a maximal value on d 10.

With the addition of 5% CHA, a significant decrease of HO-OTA was seen but only on d 7. On the other hand, OT α excretion was significantly decreased on d 7 and 10 by the addition of CHA at a level of 0.1, 1 and 5%. After feeding 3 ppm of OTA, all levels of CHA reduced significantly the excretion of OTA but only on d 14. Finally, CHA at concentrations of 1 and 5%, significantly decreased the excretion of OT α on d 7, 10 and 14.

Excretion of OTA and its Metabolites in Feces.

Figure 3 shows that the excretion of OTA and its metabolites in feces was significantly higher in the group fed 3 ppm than in the 1 ppm groups of OTA. At 1 ppm of OTA, the maximal excretion of OTA and its metabolites was reached on d 10. The addition of CHA at a level of 1 and 5% increased significantly the fecal excretion of OTA on d 7 and 10. On d 14, only CHA at 5% increased the OTA output. CHA at levels of 0.1, 1 and 5% decreased significantly the excretion of the metabolite OT α in feces on d 10. On d 7 and 14, CHA only at 5% lowered OT α excretion significantly. With 3 ppm of OTA, CHA at levels of 1 and 5% significantly increased the excretion of OTA on d 10, 14 and it significantly decreased OT α excretion at all times examined.

Excretion of Total Bile Acids in Bile and Feces.

As shown in Table 3, the addition of CHA alone to the diet significantly decreased the total bile acids excreted in bile and increased their excretion in feces. This effect was observed with all doses tested. It was noted that the addition of OTA at 1 or 3 ppm did not affect the biliary and fecal excretion of bile acids. In groups fed 1 ppm of OTA, CHA treatment significantly decreased bile acid secretion in bile and increased fecal excretion only at a level of 5%.

At 3 ppm of OTA, CHA treatment significantly affected bile acids excretion at both levels of the resin. The biliary bile acid output in rats fed diet containing

3 ppm of OTA and CHA was higher than in rats fed diet with CHA alone, indicating that interactions between the mycotoxin and CHA may have occurred affecting bile acid excretion.

Enzymuria, Kidney Function and Morphology.

For this study we have used diets containing 3 ppm of OTA and 5% of CHA. The choice of these conditions were based on pilot histologic and functional studies. Data indicate that 1 ppm of OTA did not result in significant kidney injury, while the 3 ppm dose caused nephrotoxicity. The activities of γ GT and NAG were measured in order to follow the subchronic renal intoxication by OTA and the possible protective effect of CHA. The results show that two wk ingestion of diet containing 3 ppm OTA significantly increased enzymuria compared to the control animals (Figure 4). Urinary enzyme activities were increased by 90% and more for γ GT on d 7 and 14. However, NAG activity remained in the normal range on d 7, and only increased from wk 2. This increase, in comparison with the controls, was approximately 60%. Animals treated with CHA alone for 2 wk did not show any modifications of enzymuria (31.9 ± 5.8 vs 24.2 ± 3.3 IU/l for NAG and 37.5 ± 7.1 vs 45.2 ± 10.2 IU/l for γ GT). In animals fed diets supplemented with CHA 5%, the OTA-induced elevation of γ GT and NAG activities was completely prevented by the resin. Furthermore, the values were not significantly different from the untreated controls (without OTA).

Concerning kidney function (Table 4), OTA induced a significantly decrease in creatinuria as compared with the untreated control animals. Similar results have been reported by Kane *et al*, (1986) and Baudrimont *et al*, (1995). In animals given the OTA/CHA combination, creatinuria increased but it was not statistically significantly different from corresponding controls. Glucosuria was not significantly altered by OTA or additional CHA.

Figure 5 illustrates the light microscopic appearance of rat kidney after feeding a diet containing 3 ppm of OTA. We observed damage to the proximal tubules, which are the main target segment of the nephron in OTA-induced nephropathy (Fig. 5A). When CHA was present in the diet at 5%, normal renal morphology was observed (Fig. 5B).

Hepatic Function and Morphology.

As previously mentioned, liver weight, hepatic macroscopic appearance and bile flow were not influenced by any of the treatments. However, histological examination (not shown) revealed that CHA (5%), OTA 3 ppm and the combined treatment (OTA 3ppm + CHA 5%) induced a slight vacuolization of liver parenchymal cells in the periportal area (not shown). The nature of these vacuoles seems to be hydropic, since the triglyceride content of livers did not differ markedly between groups (Untreated control: 8.5 mg/g liver; 5 %CHA , 10.1 mg/g liver; 3 ppm OTA: 11.4 mg/g liver; 5% CHA + 3 ppm OTA: 12.0 mg/g liver).

Although serum AST activity did not change with the different treatments, a slight elevation of ALT activity was observed in the diets containing 5% CHA as well as 3 ppm OTA + 5% CHA (Untreated control: 19 ± 3 ; 5% CHA: 45 ± 2 ; 3 ppm OTA : 15 ± 2 ; 5% CHA + 3 ppm OTA: 41 ± 1 IU/l), suggesting an enhanced liver cell membrane permeability when 5% of CHA was added to the diet.

DISCUSSION

The results of this study clearly demonstrate that CHA is effective in decreasing the plasma concentrations of OTA and that the concentration of CHA required to induce this effect depends of the amount of OTA contamination of food. At 1 ppm OTA, the minimal effective level of CHA was 0.1 % and at 3 ppm OTA, it was 2.5 %. The lowered OTA concentration in plasma was associated with a prevention of OTA-induced nephrotoxicity as evaluated by output of urinary enzymes (γ GT and NAG) and histologic examination.

After ingestion OTA is absorbed in a passive manner from the jejunum in the non-or- partially ionized form (Kumagai, 1988). Most OTA is bound to plasma albumin and this not only facilitates the passive absorption of the non-ionized form but also delays OTA elimination and consequently contributes to the prolonged half-life of the toxin (Marquardt and Frohlich, 1992). In addition, OTA undergoes enterohepatic circulation (Roth *et al*, 1988; Fuchs *et al*, 1988), and this leads to overexposure of susceptible target organs, such as the kidneys, to the toxin. OTA undergoes rapid hydrolysis into dihydroisocoumarine (OT α) (Galtier, 1991), which is considered to be non toxic to animals (Chu , 1974), and phenylalanine. It has been shown that this cleavage occurs in the small and large intestine via microbial activity (Galtier, 1991). Also, a small percentage of OTA absorbed is converted to hydroxy ochratoxin A (HO-OTA) by both liver and kidney (Omar and Rahimtula, 1993). This metabolite is formed by the microsomal fraction of the liver in humans, pigs and rats, in the presence of NADPH to 4(R) and 4(S)-4-hydroxy OTA (Stormer *et al*, 1981; 1983) via the cytochrome P450 system (Omar and Rahimtula, 1993; Oster *et al*, 1991). This metabolite of OTA may be more readily eliminated from the body but may also be as toxic as OTA (Creppy *et al*, 1983).

OTA is primarily excreted in the urine as OT α and to a lesser degree as OTA. The presence of OT α in urine can be explained by its absorption from the intestine following its formation (Kumagai, 1988). The formation of OT α is the most important mechanism for the removal of OTA, in addition to the excretion of OTA itself (Storen *et al*, 1982). From our studies, dietary CHA affected the excretion pattern of both OTA and its metabolites (OT α and HO-OTA). Indeed, the presence of CHA in the diet decreased the urinary secretion of OTA and its metabolites, which may be explained by the findings of lower OTA levels in plasma. This is more evident with the diet containing 3 ppm of OTA, where excretion rates were higher than with 1 ppm of OTA. OTA was also primarily excreted in the urine as OT α and, to a lesser degree, as OTA and HO-OTA, which is in agreement with the study of Storen *et al*, (1982).

In both bile and feces, OTA was primarily excreted as the intact form and in a much smaller amounts as OT α and HO-OTA. The addition of CHA decreased the secretion of OTA and its metabolites in bile. Recent studies have shown that a considerable portion of OTA was secreted in the bile in conjugated forms (glucuronides and sulfates) (Kane *et al*, 1986), and that the conjugates probably were hydrolyzed to OTA or OT α by the intestinal flora before reabsorption (Delacruz and Bach, 1990). It was also noted that OTA excretion in feces was enhanced by the addition of CHA, while elimination of its metabolites was decreased. Since there was more OTA in feces, it was expected that more OT α would be produced and excreted. However, OT α excretion was lower, which may be attributed to shortened transit time of fecal matter in the intestine (due to presence of the resin in the diet) and/or decreased exposure of the toxin to bacterial flora (binding of OTA by CHA), or even to modification of these flora.

The exact mechanism(s) by which CHA modifies the excretion of OTA in urine and feces is unclear. Alteration of the bile acid pool and enterohepatic circulation of OTA may be one possible mechanism. Bile acids play not only an

important role in the absorption of fats and fat-soluble vitamins, but also of xenobiotics (Carey, 1983). It is known that OTA is absorbed in the upper portion of the gastrointestinal tract, mainly in the lipid-soluble non-ionized form by diffusional movement (Kumagai, 1988). It is possible that bile acids are required for increase OTA absorption. CHA is an anion exchange resin used to treat hypercholesterolemia. Administered orally, CHA binds with bile salts in the gastrointestinal tract via ion exchange, breaks their enterohepatic circulation, and increases their fecal elimination (Polli and Amidon, 1995). Thus, it is possible that CHA decreases the OTA bioavailability via a decrease of bile acids required for absorption. Furthermore, preliminary results showed that OTA toxicity was enhanced when rats were fed a phospholipid-enriched diet, known to enhance bile acids secretion (Rioux *et al*, 1988). This provides further support for the importance of bile acids in OTA absorption which requires further investigation. Agents that enhance the bile acid secretion should therefore decrease OTA toxicity if this mechanism of action is involved in OTA toxicity.

Another explanation for the effects of CHA on OTA toxicokinetics may be binding of the toxin by CHA, which would result in decreased intestinal absorption. When the chemical structure of OTA is compared with that of bile acids, there are similarities. Indeed, both molecules contain hydrophobic and hydrophilic domains and have similar molecular weights. Thus, it is hypothesized that these compounds may act similarly in the gastrointestinal tract. OTA has two ionizable groups, the carboxyl group from phenylalanine and the 8-hydroxyl group, both of which can exist in the ionized or non-ionized form under physiological conditions. OTA has a pKa of 7.1 (Chu, 1974), and may exist in its negative form in the lower section of the gastrointestinal tract, where it may react with CHA ionically. Under these conditions, the negatively-charged OTA molecules would bind to the positively-charged groups of CHA. Preliminary results from *in vitro* studies give support to the view of binding of CHA and OTA (Kerkadi *et al*, unpublished), as at least in part, the mechanism by which CHA reduces OTA concentrations in plasma, urine, and bile, and increases its

clearance via feces. Resins with more accessible functional groups than CHA may have better capacity to bind OTA and decrease toxicity.

In conclusion, CHA added to the diet, reduces the concentrations of OTA in plasma, increases its clearance by way of the feces and decreases the amount excreted in bile and in urine. By these effects, the kidney is exposed to lower amounts of the toxin, resulting in decreased renal damage.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by strategic grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors thank Mr. Maurice Audet for his expert technical assistance.

REFERENCES

Bailey, C.A., Gibson, R.M., Kabena, L.F., Huff, W.E. and Harvey, R.B. (1989) Ochratoxin A and dietary protein. 2. Effects on hematology and various clinical chemistry measurements. *Poult. Sci.* 68: 1664-1671.

Bailey, C.A., Gibson, R.M., Kubena, L.F., Huff, W.E. and Harvey, R.B. (1990) Impact of phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. 2. Effects on hematology and clinical chemistry. *Poult. Sci.* 69: 420-425.

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: 147-154.

Carey, M.C. (1983) Measurement of the physical-chemical properties of bile salt solutions. In *Bile acid in Gastroenterology*. (Ed) L. Barbara, 19-56, Boston, MA MTP press.

Chelkowski, J., Golinski, P., Godlewska, B., Radomska, W., Szabotko, K. and Wiewiorowska, M. (1981) Mycotoxins in cereal grains. Part IV. Inactivation of ochratoxin A and other mycotoxins during ammoniation. *Nahrung* 25: 631-637.

Chu, F.S. (1974) Studies on ochratoxin. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 2: 499-524.

Creppy, E.E., Stormer, F.C., Rosenthaler, R. and Dieheimer, G. (1983) Effects of two metabolites of ochratoxin A, [4R]-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin, on the immune response in mice. *Infect. Immunol.* 39: 1015-1018.

Creppy, E.E., Kane, A., Dirheimer, G., Lafarge-Frayssinet, C., Mousset, S. and Frayssinet, C. (1985) Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicology Letters* 28, 29-35.

Creppy, E.E., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Moncharmont, P., Fouillet, B., Chambon, P. and Dirheimer, G. (1991) Human ochratoxicosis in France. In: *Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. (Eds) M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch, 145-151, Lyon, IARC Scientific Publications No. 115.

Delacruz, R. and Bach, P.H. (1990) The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. *J. Biopharmacol. Sci.* 1: 277-304.

De Scott, B. (1965) Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 25: 213-222.

Dierickx, P.J. (1981) Urinary gamma-glutamyl transferase as an indicator of acute nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol.* 47: 209-215.

Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (1991) Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In: *Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. (Ed) J. Chelkowski, 441-476, Amsterdam, Elsevier.

Fuchs, R., Radic, B., Peraica, M., Hult, K. and Plestina, R. (1988) Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats. *Period. Biologorum* 90: 39-42.

Frohlich, A.A., Marquardt, R.R. and Clarke, J.R. (1997) Enzymatic and immunological approaches for quantitation and confirmation of ochratoxin A in

swine kidneys. *J. Food. Protection* 60, 172-176

Galtier, P. (1991) Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. In: *Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours.* (Eds) M. Categnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N Chernozemsky and H. Bartsch , 187-200, Lyon, IARC Scientific Publications No. 115.

Horak, E., Hopfer, S.M. and Sunderman, W.F. (1981) Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. *Clin. Chem.* 271: 1180-1185.

Hult, K., Hokby, E., Hagglund, U., Gatenbeck, S., Rutqvist, L. and Sellyey, G. (1979) Ochratoxin A in pig blood: Method of analysis and use as a tool for feed studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 772-776.

Josefsson, B.G.E. and Moller, T.E (1980) Heat stability of ochratoxin A in pig products. *J. Food Sci. Agric.* 31: 1313-1315.

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.

Kane, A., Creppy, E.E., Roth, A., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1986b) Distribution of the H label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Arch. Toxicol* 58, 219-224.

Kanisawa, M. and Suzuki, S. (1978) Induction of renal and hepatic tumours in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann* 69: 599-600.

Kos, R., White, J.L., Stanley, L.H. and Borin, M.T. (1991) Effect of competing anions on binding of bile salts by cholestyramine. *Pharm. Res.* 8: 238-241.

Krogh, P., Axelsen, N.H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., Iarsen, A.E., Madsen, A., Mortensen, H.P., Moller, T., Petersen, O.K., Ravnskov, U., Rostgaard, M. and Aalund, O. (1974) Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand* 246, 1-21.

Krogh, P., Elling, F., Hald, B., Iarsen, A.E., Lillehoj, E.B., Madsen, A., Mortensen, H.P., Rasmussen, F. and Ravnskov, U. (1979) Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Vet. Pathol* 16, 466-475.

Krogh, P. (1987) Ochratoxin A in food. In: *Mycotoxins in Food*. (Ed) P. Krogh, pp 97-121, New York, Academic Press.

Kuiper-Goodman, T. and Scott, P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.

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

Lea, T., Steien, K. and Stormer, F.C. (1989) Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 107: 153-159.

Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A.M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E.E. and Bacha, H. (1995) Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch. Toxicol.* 69: 552-558.

Madhyastha, M.S., Frohlich, A.A. and Marquardt, R.R. (1992) Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.* 30: 709-714.

Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. and Abramson, D. (1990) Ochratoxin A: an important western canadian storage mycotoxin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 991-999.

Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.

Mayura, K., Parker, R., Berndt, W.O. and Phillips, T.D. (1984) Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: partial protection by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1186-1188.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S. and Fourie, L (1965) Mycotoxins Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, Metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *J. Chem. Soc.* 7083-7088.

NTP (1989) Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (gavage studies). In: G. Boorman (Ed), National Institute of Health Publication No. 89-2813, US department of Health and Human Resources, Research Triangle Park, NC, US.

Omar, R.F. and Rahimtula, A.D. (1993) Possible role of an iron-oxygen complex in 4(S)-4-hydroxyochratoxin A formation by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 46: 2073-2081.

Oster, T., Jayyisi., Creppy, E.E., El amri , H.S., Batt, A.M. (1991) Characterisation of pig liver, purified cytochrome P450 isoenzymes for ochratoxin A metabolism studies. *Toxicology Letters* 57, 203-214.

Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N and Categnaro, 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.

Pfohl-Leszkowicz, A., Chakor, K., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1991) DNA-adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In: *Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours.* (Eds) M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch, pp 245-253, Lyon, IARC Scientific Publications No. 115.

Rioux, F., Tuchweber, B., Yousef, I.M. (1988) Dietary lecithin increases bile formation in rats. *Gastroenterology.* 94: A621

Roth, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Kane, A., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48: 293-308.

Rotter, R.G., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1989a) Ochratoxin A toxicity in growing chicks: effect of supplemental dietary phenylalanine. *Nutr. Rep. Inter.* 40: 1091-1100.

Rotter, R.G., Frohlich, A.A. and Marquardt, R.R (1989b) Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in leghorn chicks. *Can. J. Vet. Res.* 53: 449-453.

Rotter, R.G., Marquardt, R.R and Frohlich, A.A. (1990) Ensiling as a means of reducing ochratoxin A concentrations in contaminated barley. *J. Food. Sci. Agric.* 50: 155-166.

Storen, O., Holm, H. and Stormer, F.C. (1982) Metabolism of ochratoxin A by rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 785-789.

Stormer, F.C., Hansen, C., Pedersen, J.I., Hvistendhal, G. and Aasen, A.J. (1981) Formation of (4R)- and (4S)- 4- hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1051-1056.

Stormer, F.C., Storen, O., Hansen, C., 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1183-1187.

Szasz, G. (1969) A kinetic photometric method of serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 15: 124-136.

Weber, A.M, Chartrand, L, Gordon, S and Roy, C. (1972) The quantitative determination of fecal bile acid in children by the enzymatic method. *Clin. Chim. Acta* 75: 524-531.

Xiao, H., Marquardt, R.R., Abramson, D. and Frohlich, A.A. (1995) Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ Microbio* 62, 648-655.

Xiao, H., Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. and Ling, Y.Z. (1996) Synthesis and structural elucidation of analogs of ochratoxin A. *J. Agric. Food. Chem* 43, 524-530

Table 1 **Effect of CHA on the urinary volume and the fecal weight from rats fed a diet containing 1 or 3 ppm of the mycotoxin**

OTA ppm	CHA g/100g	Urinary volume ^a (ml)	Fecal weight ^a (g)
0	0	9.2 ± 2.7	1.5 ± 0.3
0	0.1	9.7 ± 2.8	2.0 ± 0.1
0	2.5	8.0 ± 3.2	3.0 ± 0.3 ^{b,c}
0	5	9.0 ± 1.2	3.7 ± 0.5 ^{b,c}
1	0	12.3 ± 2.2	1.9 ± 0.1
1	0.1	18.3 ± 4.5	2.0 ± 0.1
1	1	10.3 ± 1.8	2.5 ± 0.1
1	5	12.6 ± 2.3	4.6 ± 0.5 ^{b,c}
3	0	16.4 ± 3.0	2.0 ± 0.2
3	0.1	11.0 ± 1.6	2.0 ± 0.4
3	1	11.7 ± 2.9	2.0 ± 0.3
3	2.5	9.7 ± 5.8	3.3 ± 0.3 ^{b,c}
3	5	9.9 ± 1.3 ^c	5.1 ± 0.4 ^{b,c}

^a Daily mean (d11-14) , values expressed as mean ± SEM (5-6 rats/group), Significantly different from control group p<0.05. ^c Significantly different from their respective group treated with OTA alone (at 1ppm or 3ppm) p<0.05.

Table 2 **Effect of CHA on the excretion of OTA, OT α and HO-OTA in bile from rats fed a diet containing 1 or 3 ppm of the mycotoxin**

OTA ppm	CHA g/100g	OTA ^a ng/h/g liver	OT α ^a ng/h/g liver	HO-OTA ^a ng/h/g liver
1	0	5.10 \pm 0.99	0.58 \pm 0.21	0.83 \pm 0.38
1	0.1	5.47 \pm 1.41	0.56 \pm 0.21	0.10 \pm 0.10
1	1	2.97 \pm 0.68 ^b	0.23 \pm 0.11	0.35 \pm 0.23
1	5	1.43 \pm 0.44 ^b	0.38 \pm 0.23	nd
3	0	12.43 \pm 4.30	1.2 \pm 0.34	3.03 \pm 1.36
3	0.1	14.20 \pm 2.60	1.54 \pm 1.11	2.10 \pm 0.84
3	1	6.60 \pm 1.66	0.15 \pm 0.03 ^c	1.05 \pm 0.40 ^c
3	5	3.83 \pm 0.85 ^c	0.04 \pm 0.02 ^c	0.43 \pm 0.26 ^c

^a Values expressed as means \pm SEM (4-5 rats)

nd: not detected

^b Significantly different from the group treated with 1 ppm OTA, $p < 0.05$

^c Significantly different from the group treated with 3 ppm OTA, $p < 0.05$

Table 3: **Effect of CHA on the excretion of total bile acids in bile and feces in rats fed a diet containing 1 or 3 ppm of the mycotoxin**

OTA ppm	CHA g/100g	Excretion in bile ^a μmole/day	Excretion in feces ^a μmole/day
0	0	700 ± 104	9 ± 2
0	0.1	489 ± 104 ^b	43 ± 5 ^b
0	2.5	279 ± 19 ^b	43 ± 5 ^b
0	5	165 ± 12 ^b	115 ± 5 ^b
1	0	664 ± 134	12 ± 2
1	0.1	564 ± 71	16 ± 1
1	5	205 ± 12 ^{b,c}	99 ± 32 ^{b,c}
3	0	699 ± 56	27 ± 6 ^b
3	2.5	377 ± 31 ^{b,c,d}	39 ± 2 ^{b,c}
3	5	204 ± 70 ^{b,c}	114 ± 12 ^{b,c}

^a Values expressed as means ± SE (n=3-4), bile and feces were collected on d14. ^b Significantly different from the control group, p< 0.05 Significantly different from group treated with OTA alone , p< 0.05 ^d Significantly different from the group treated with CHA 2.5%, p < 0.05

Table 4: **Effect of CHA on the excretion of creatinine and glucose in the urine from rats fed a diet containing 3 ppm of the mycotoxin**

Treatment	Creatinuria (mg/kg bw)	Glucosuria (mg/kg bw)
Control ^a	23.2 ± 5.0	16.4 ± 3.0
OTA 3ppm	14.7 ± 1.2 ^b	11.8 ± 1.2
CHA 5%	23.2 ± 5.2	15.9 ± 2.3
OTA 3ppm + CHA 5%	17.5 ± 2.5	18.1 ± 1.4

Note. Values expressed as mean ± SEM (n= 4-6)

^a Untreated control without OTA or CHA

^b Significantly different from the control group p<0.05

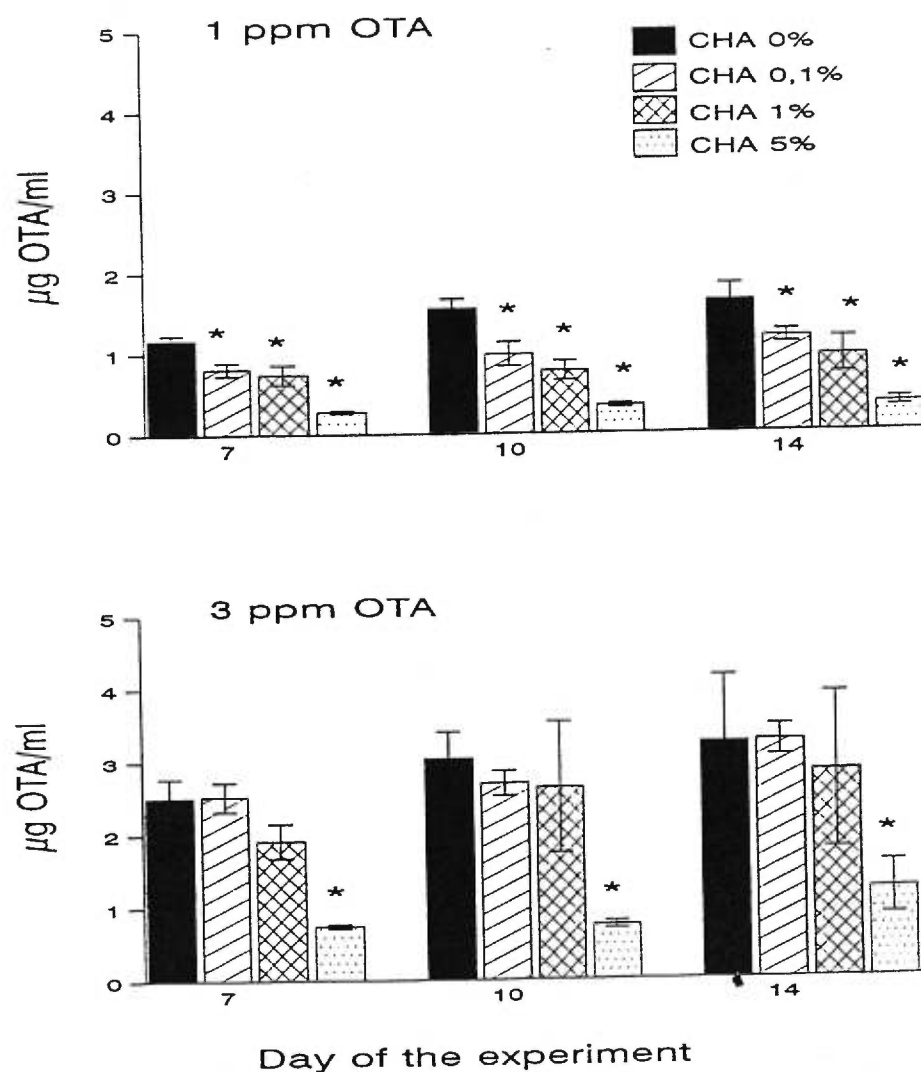


Figure 1

Effect of cholestyramine (CHA) on plasma concentration of ochratoxin A (OTA) in rats fed diet containing 1 and 3 ppm of the mycotoxin. Plasma OTA concentration was decreased by addition of the resin in a dose dependent manner. Bars represent the means \pm standard error of 5-6 rats per group. Asterisk indicates significantly different from the group treated with OTA alone (without CHA), $p < 0.05$.

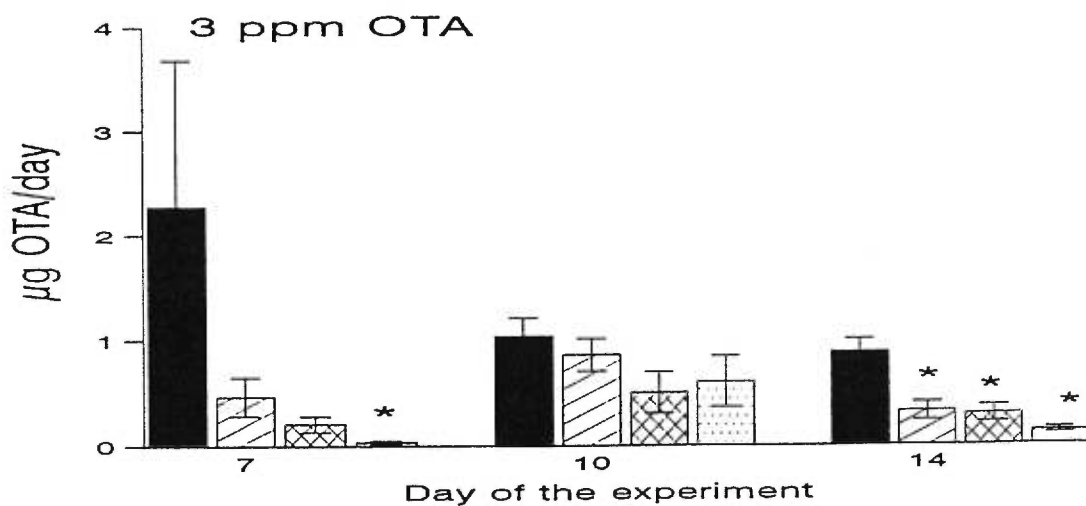
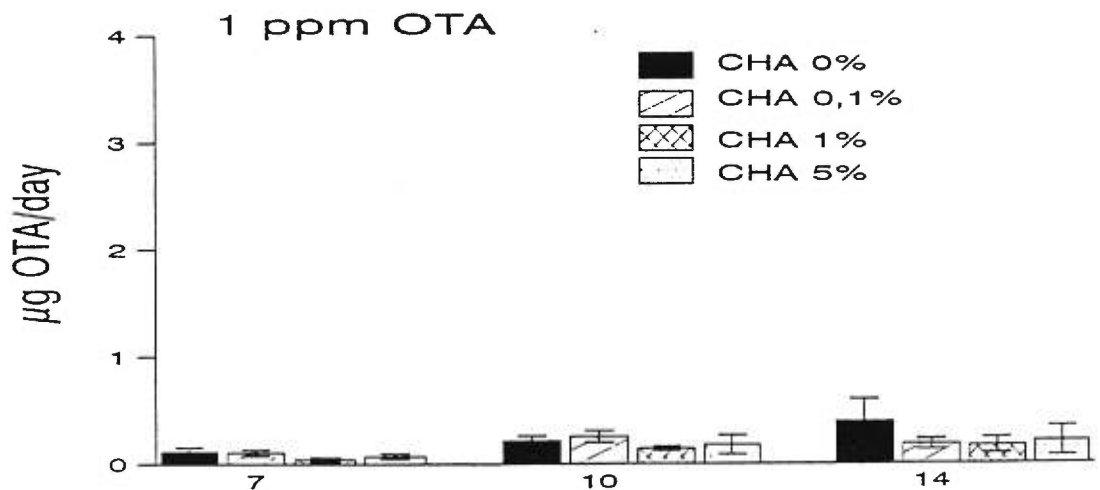
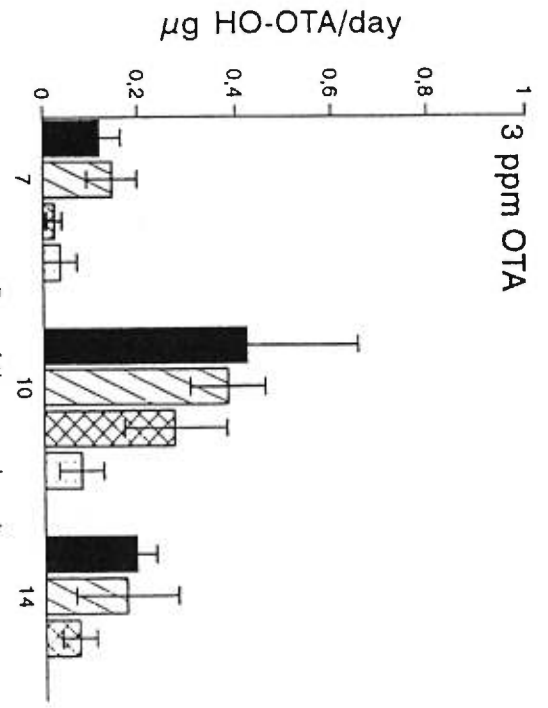
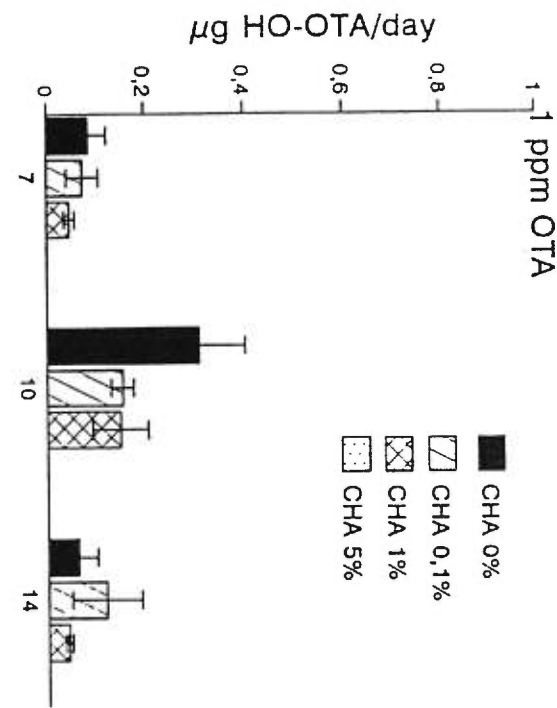
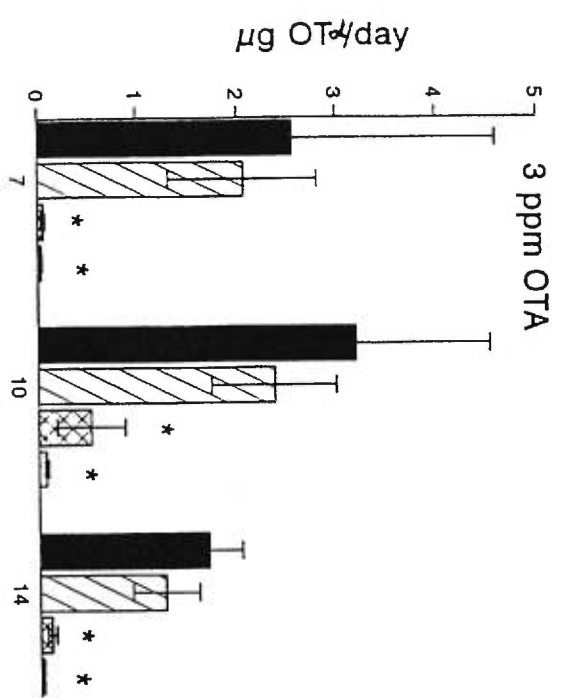
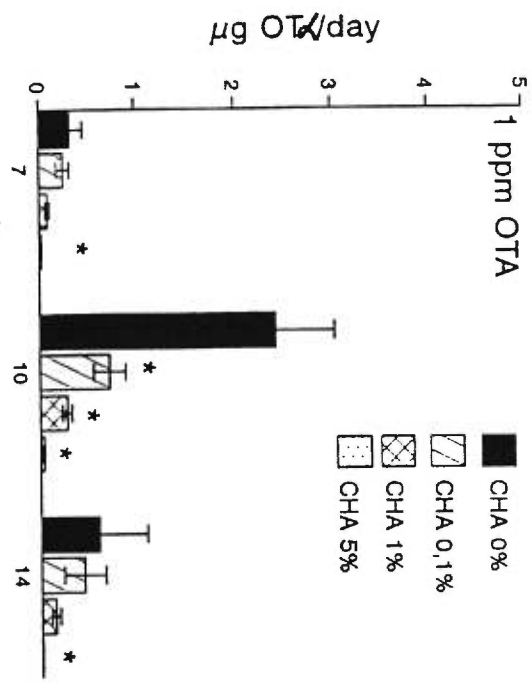


Figure 2

Effect of CHA on urinary excretion of OTA, OT α and HO-OTA. Bars represent the means \pm standard error of five to six rats per group.

Asterisk indicates significantly different from the group treated with OTA alone (without CHA), $p < 0.05$.



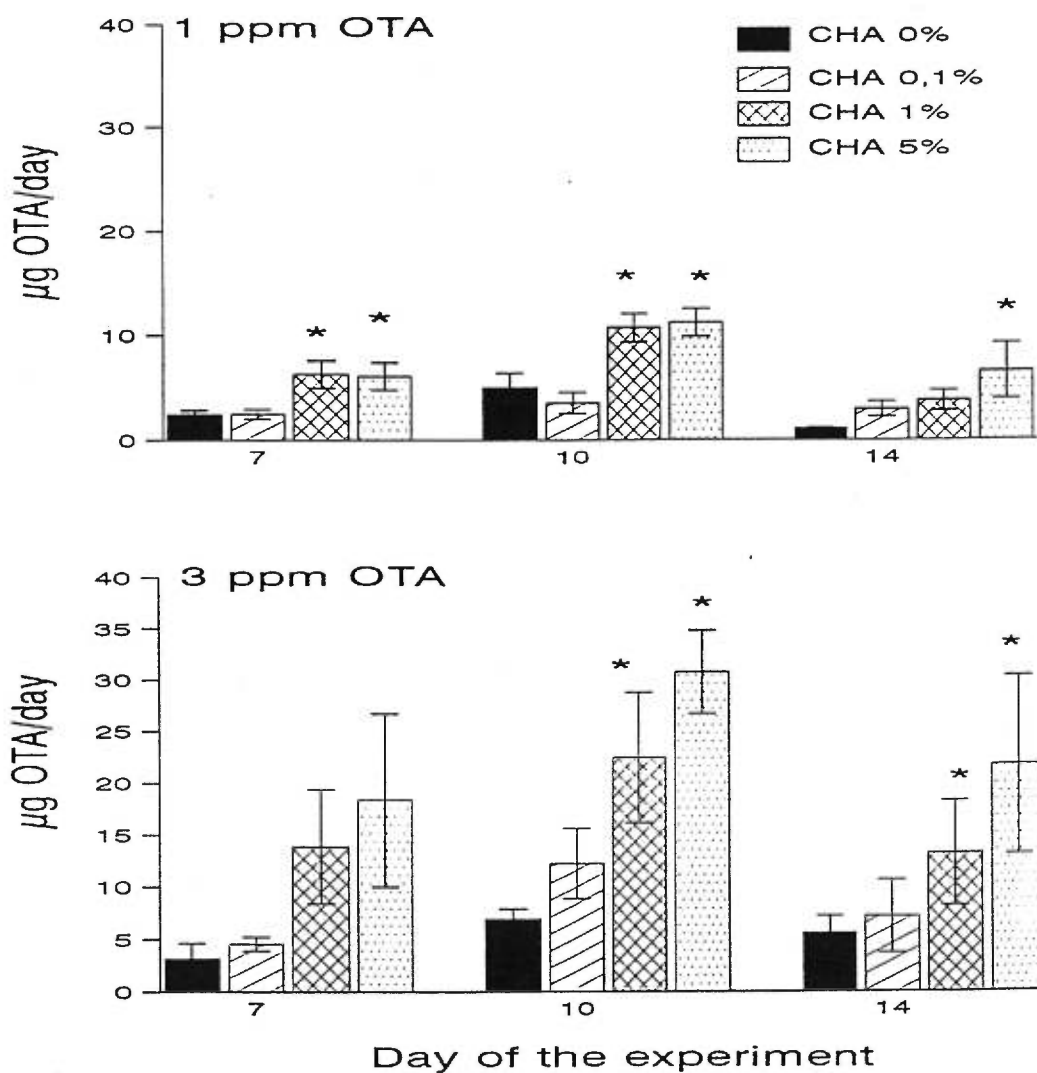
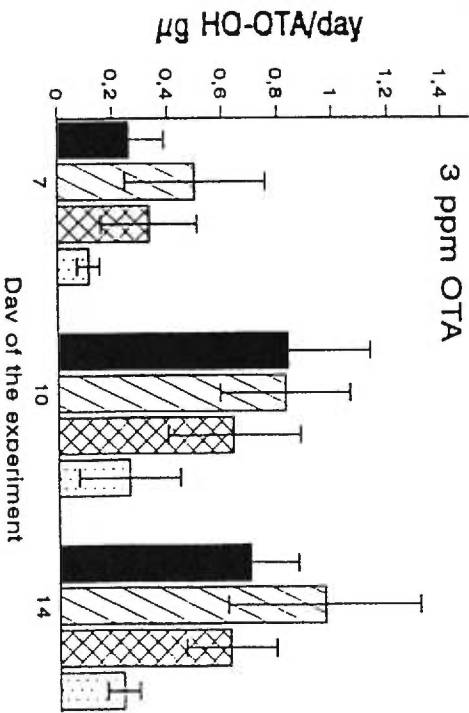
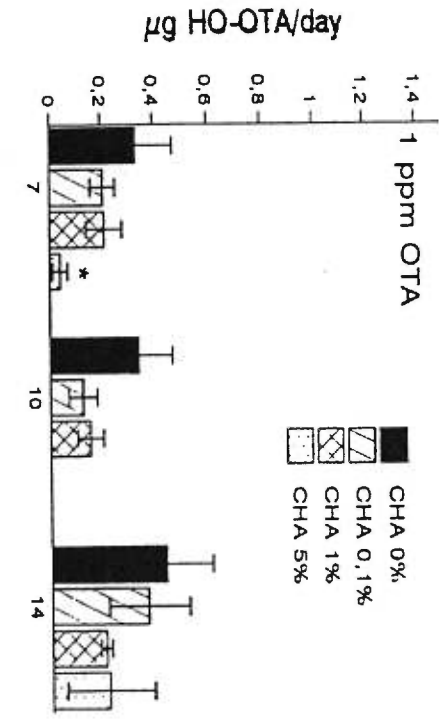
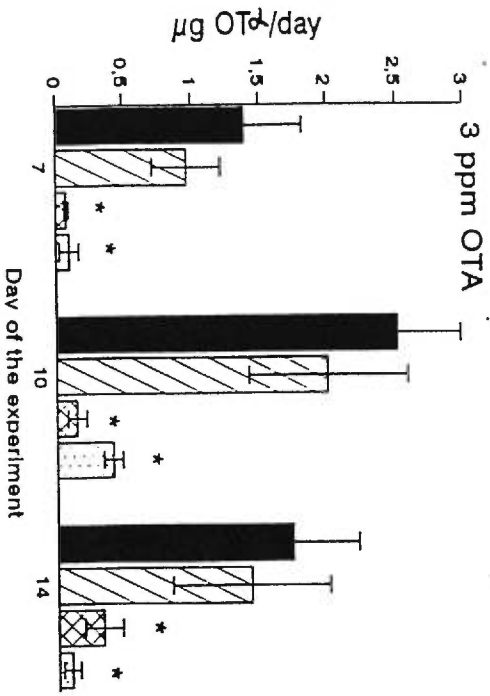
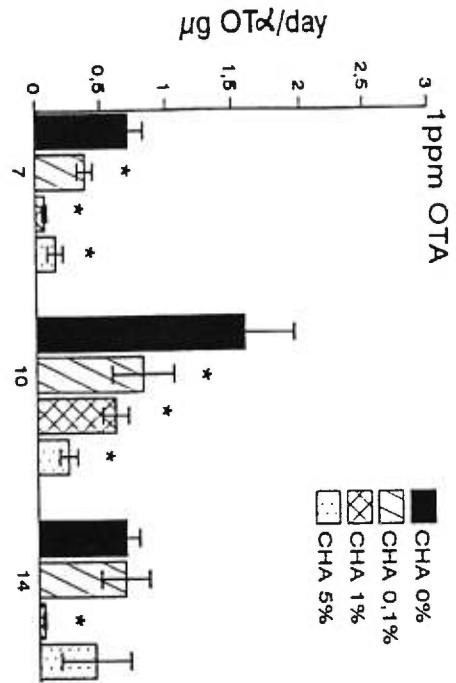


Figure 3

Effect of CHA on excretion of OTA, OT α and HO-OTA in feces. Bars represent the means \pm standard error of five to six rats per group. Asterisk indicates significantly different from the group treated with OTA alone (without CHA), $p < 0.05$.



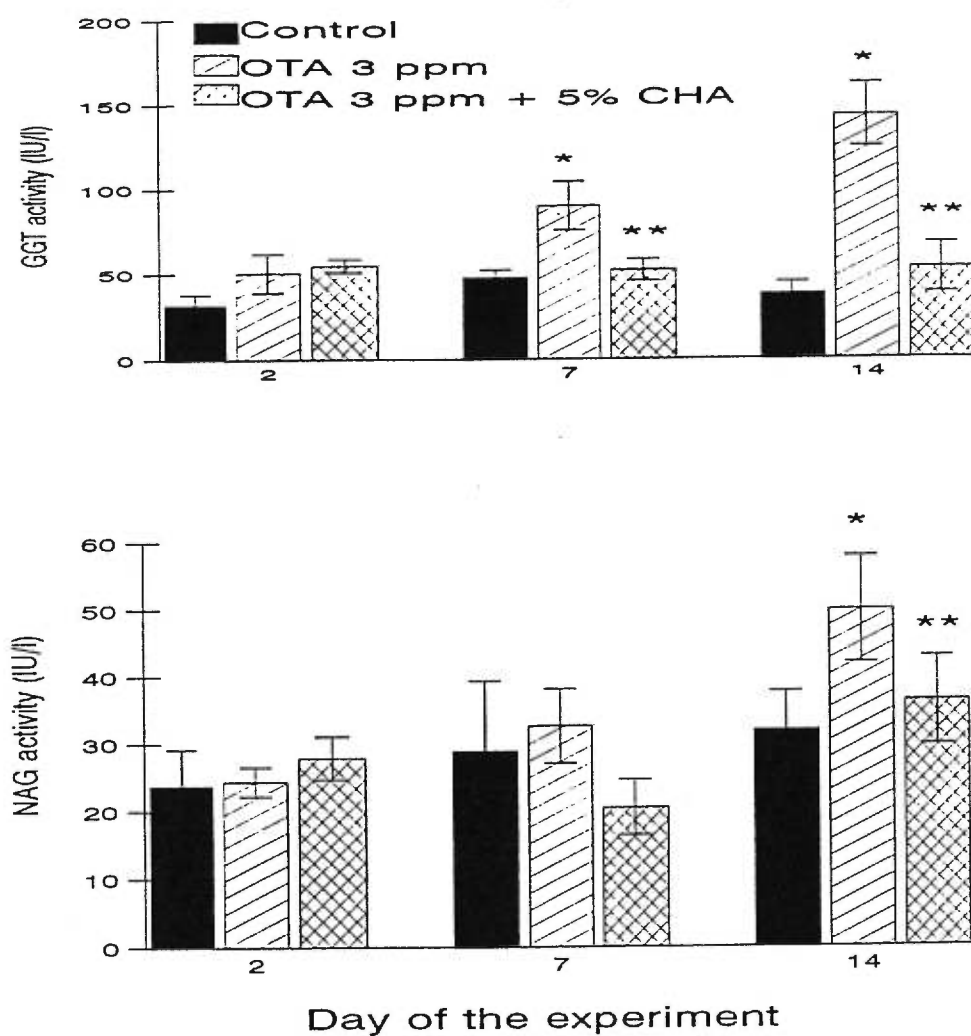


Figure 4

Effect of CHA on urinary activities of γ GT and NAG in rats fed diet containing 3 ppm of OTA. CHA protected animals from OTA-induced enzymuria. Bars represent the means \pm standard error of five to six rats per group.

Asterisk indicates significantly different from control group (without OTA or CHA) $p < 0.05$; double asterisk indicates significantly different from OTA group, $p < 0.05$

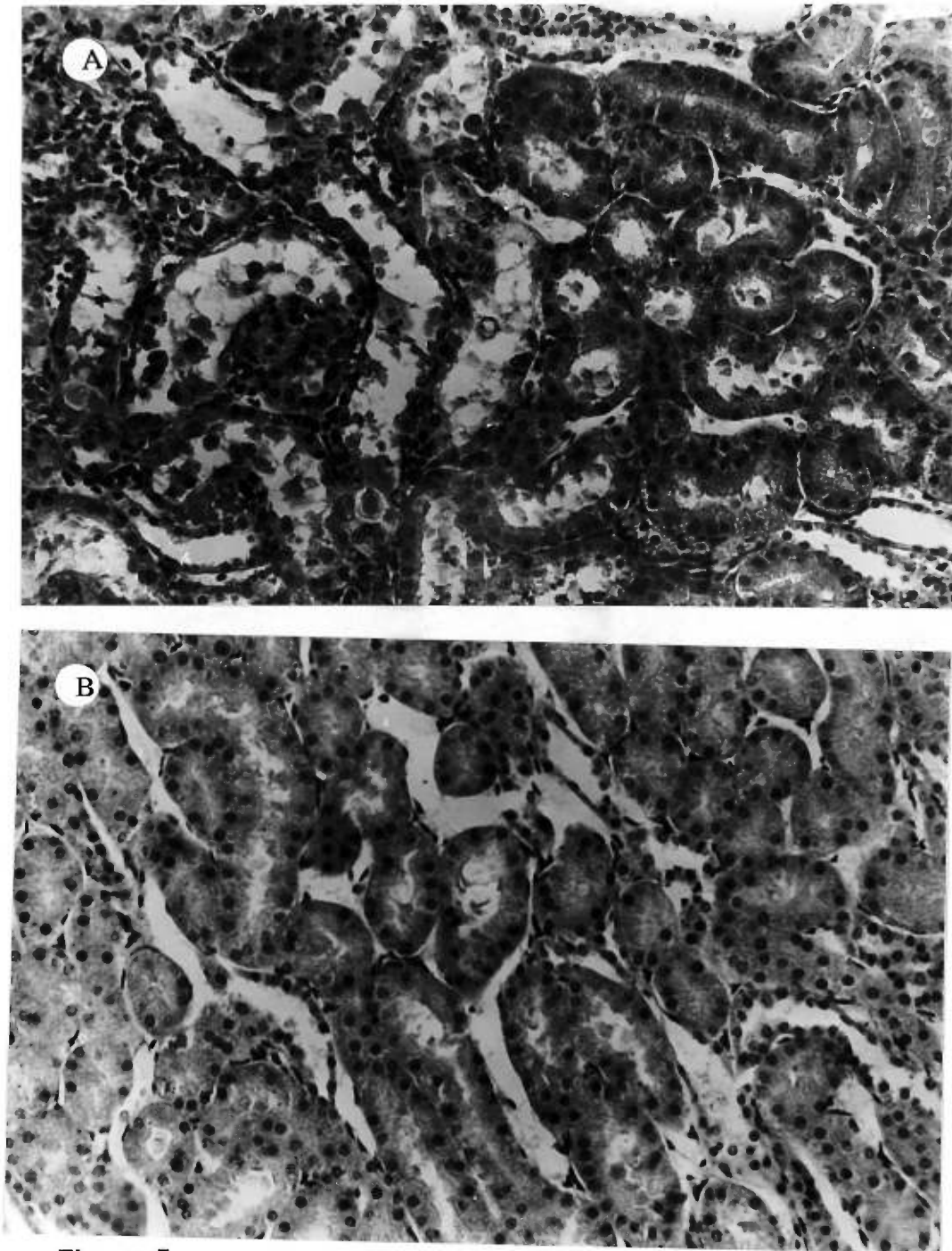


Figure 5

Light microscopy of kidney from rat fed diet containing 3 ppm of OTA for 14 days. (A) Without CHA, proximal renal tubules were affected by the toxin (B) With addition of 5% CHA, kidney appeared virtually normal. x200.

Chapitre 3: Article II

**Cholestyramine protection against ochratoxin A (OTA) toxicity:
Role of OTA sorption by the resin and bile acid enterohepatic
circulation**

Soumis à **Journal of Food Protection**

Avant- propos 2

Faisant suite au précédent article qui avait montré le rôle protecteur de la CHA contre la néphrotoxicité de l'OTA, on a émis l'hypothèse que la diminution de la concentration de l'OTA dans le plasma et l'augmentation de son excrétion fécale seraient dues à une liaison directe de la toxine par la CHA dans l'intestin et/ou à un effet indirect via le pool des AB. Cet article examine les deux mécanismes possibles de cette protection.

Dans la première partie du travail, nous avons étudié la liaison de l'OTA par la CHA *in vitro*. 10 mg de CHA ont été additionnés à 10 ml d'une solution d'OTA à différentes concentrations (1- 5 mM). Nous avons fait une comparaison avec deux acides biliaires (AB) qui sont normalement présents chez le rat (le taurocholate et le taurodéoxycholate). Après une période d'incubation de deux heures, une quantité du surnageant (1mL) a été utilisée pour doser l'OTA par HPLC et les AB par la méthode enzymatique. La liaison de l'OTA a été aussi étudiée en présence du NaCl (50-200 mM). Dans le but de voir s'il y a une compétition entre l'OTA et AB sur les sites de la liaison de la CHA, nous avons mis l'OTA en présence du taurocholate. La quantité d'OTA et les AB liée par la CHA a été calculée par la différence entre la quantité initiale ajoutée et la quantité restante à l'équilibre. L'équation de Langmuir a été utilisée pour déterminer les constantes d'affinité et la capacité maximale de liaison.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons fait une étude *in vivo* pour déterminer le rôle des AB dans l'absorption de l'OTA. Pour ce faire, les rats étaient partagés en trois groupes: groupe 1 (contrôle), groupe 2 (la circulation entérohépatique a été interrompue pendant 6 heures) et groupe 3 (Sham: pour tenir compte du stress occasionné par la chirurgie). Les rats ont reçu de l'OTA (5 mg/kg PC) par gavage. Les prélèvements sanguins ont été effectués à 1, 3 et 8 heures après le gavage.

Running Head: Cholestyramine and ochratoxin A toxicity

**Cholestyramine protection against ochratoxin A (OTA) toxicity:
Role of OTA sorption by the resin and bile acid enterohepatic
circulation**

*Abdelhamid Kerkadi ¹, Claude Barriault , Ronald R. Marquardt ,
Andrzej A. Frohlich ⁴, Ibrahim M. Yousef ², Xiao Xia Zhu ³, and Beatriz
Tuchweber ^{1*}*

*¹Department of Nutrition , ² Department of Pharmacology and ³ Department of
Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-ville, Montréal,
Québec, Canada H3C 3J7. ⁴ Department of Animal Science, University of
Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada R3T 2N2.*

Key Words: Ochratoxin A, Cholestyramine, sorption, Bile salts depletion

* Author for Correspondence: Dr. Beatriz Tuchweber

Département de Nutrition
Université de Montréal
C.P. 6128, succ. Centre-ville
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7
Telephone: (514) 343-6393
FAX: (514) 343-7395

ABSTRACT

We have shown that the addition of cholestyramine (CHA, a resin known to bind bile salts in the gastrointestinal tract) to OTA- contaminated diets reduced plasma levels of the toxin and prevented OTA-induced nephrotoxicity. To elucidate the mechanism of action of CHA, we carried out *in vitro* experiments to determine whether the resin may bind the toxin. For comparative purposes binding of bile salts to the resin was also examined. Results showed that CHA binds both OTA and bile salts (taurodeoxycholate [TDC]and taurocholate [TCA]). Also, CHA showed greater affinity for OTA and TDC than for TCA. At 1 mM concentration, 96% of OTA and 80% of TDC were bound to the resin while for TCA, binding was only 50%. However, saturation of the resin was reached at higher levels with bile acids compared to OTA (3.67 mmol/ g resin for TCA and 3.71 mmol/ g resin for TDC versus 2.85 mmol/ g resin for OTA). To characterize the nature of the binding of the toxin to CHA, NaCl (0 to 200 mM) was added to a fixed amount of OTA or bile acids. As expected, TCA sorption was decreased by the addition of NaCl (< 50 mM), indicating electrostatic binding. However, OTA and TDC sorption was decreased only at high concentrations of NaCl (> 150 mM), suggesting a stronger binding to the resin than that shown with TCA. Sequential competitive studies demonstrated that CHA binds OTA more than TCA. The results of the *in vivo* study show the role of bile salts in OTA absorption. The toxin's plasma levels at 1 and 3 h after a single oral dose of OTA were significantly decreased in bile salt depleted rats compared to the control. Thus, the alteration of the bile salt biliary pool and OTA enterohepatic circulation may be an additional mechanism of action of the resin against mycotoxin toxicity.

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by fungi such as *Penicillium Verrucosum* (6) and *Aspergillus Ochraceus* (5,6). OTA may be contained in various grains, cereals, animal feeds, meats, and be found in blood of animals and humans after consumption of contaminated food (2, 13, 16, 18, 20, 21, 25). OTA can induce nephrotoxicity in various animal species (14-16), and is possibly involved in the Balkan endemic nephropathy in humans (16). It has also been shown that OTA is an immunosuppressor (4, 17), a teratogen (22), a genotoxin (3, 26) and a carcinogen (11, 24).

Many physical, chemical, and biological methods have been used to detoxify OTA but with limited success. The most encouraging results have been obtained with the use of non-nutritive sorptive materials, such as cholestyramine (CHA) (12, 19). CHA is an anion-exchange resin used clinically to treat hypercholesterolemia. Administered orally, CHA binds bile salts in the gastrointestinal tract, interrupting the enterohepatic circulation of bile salts, and increasing their fecal excretion (9, 27). CHA was used as a sorbent to prevent the absorption of mycotoxins such as zearalenone and OTA (19, 28, 30) and also *Escherichia coli* enterotoxin (23). Recently, we have shown that the addition of CHA to OTA-contaminated diets reduced plasma levels of the toxin that was associated with enhanced fecal excretion and prevention of OTA-induced nephrotoxicity (12). We hypothesized that the decreased OTA plasma levels in CHA treated animals may be explained, at least in part, by the direct binding of the toxin by the resin, resulting in a decreased intestinal absorption. This was hypothesized because that there are similarities in the chemical structures of OTA and bile acids. Both substances have similar molecular weights and hydrophobic domains, making it likely that they could behave in a similar manner in the gastrointestinal tract. OTA contains 7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarin that is linked through the 7-carboxy group to L- β phenylalanine by an amide bond (21). The carboxyl group from phenylalanine and the 8-hydroxyl group, can both exist in the ionized or non-ionized form under physiological conditions. In the gastrointestinal tract, negatively-

charged molecules of the toxin could bind to positively-charged groups of the resin that would decrease the absorption of OTA. An additional mechanism by which CHA offers protection against the mycotoxin may be the reduced enterohepatic bile salt circulation induced by the resin. It is well established that bile salts play an important role in the intestinal absorption of xenobiotics (1), it may be that they do the same with OTA.

The objectives of this study were: (i) to determine whether CHA binds OTA *in vitro* and to characterize the nature of this binding. (ii) to evaluate *in vivo* the role of the enterohepatic circulation of bile salts on OTA bioavailability in rats. For comparative purposes, we carried out studies on the binding of bile salts to the resin, and on the interaction between OTA and taurocholate (TCA) resin binding.

Material and methods

In vitro studies

Materials

All chemicals were analytical grade and used as received. Taurocholic acid sodium salt (TCA) and cholestyramine (CHA) were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO). Taurodeoxycholic acid sodium salt (TDC) was from Calbiochem Co (La Jolla, CA, USA). NaCl and sodium bicarbonate (NaHCO_3) were from Fisher Chemical (Fair Lawn, NJ, USA). OTA was produced by *Aspergillus Ochraceus* from Wilhelm (NRRI-3174) and isolated as described previously (12).

Equilibrium binding studies

The binding studies were carried out using OTA or bile salts (TCA and TDC: the main primary and secondary bile salts in rats), the sorbates, dissolved in sodium bicarbonate solution (0.1 N; pH 8.25). A 10 mg sample of CHA, the sorbent, was added to 10 ml of OTA or bile salts solution of varying concentrations (1-5 mM) for OTA and (1-7 mM) for bile salts. Control tubes containing similar quantities of OTA or bile salt solutions were also prepared and served as blanks. All tubes were mechanically shaken at room temperature on a mechanical wrist-action shaker (Brunell, Corp, Pittsburg, PA) for 2 hours (time necessary to reach equilibrium) (34). After the incubation period, the sequestrant in the tubes was sedimented by centrifugation at 45000 x g for 15 min, and 1 ml of the supernatant was assayed for OTA by high performance liquid chromatography, and for bile salts by enzymatic methods, as described in detail elsewhere (12).

OTA and bile salts binding in the presence of NaCl was determined in a similar manner, except that only one initial concentration each of OTA and bile salts

were used (2 mM for OTA and 3 mM for bile salts). These studies were conducted by first adding OTA or bile salt solutions and equilibrating as above, then adding an aliquot of concentrated NaCl solution that resulted in concentrations ranging from 0-200 mM. These samples were then equilibrated for 2 hours, centrifuged and assayed for OTA and bile salts as above.

Sequential competitive binding of OTA and TCA was studied by incubation of CHA with solutions containing OTA and TCA. The ratio of OTA to TCA was held constant at 1, while the total concentration was varied (1, 3 and 5 mM). In another experiment, the concentration of OTA was held constant (2 mM), while the concentration of TCA was varied from 1 to 6 mM. Following a 2-hour period, the samples were centrifuged and the supernatant analyzed for OTA and TCA.

The amount of OTA or bile salts bound to the CHA was calculated by the difference between the initial amount added and the amount at equilibrium. A least-squares non-linear curve-fitting procedure was used in the treatment of the experimental data by the Langmuir equation and its modified forms in order to determine the constant's affinity and the capacity. The Langmuir equation in the following form was used:

$$Q = Q_m K C_{eq} / (1 + K C_{eq}) \quad (1)$$

where Q is the quantity of OTA and bile salts bound per unit weight of the resin (mmol/g), Q_m the apparent maximum binding capacity of the resin, C the concentration of OTA and bile salts at equilibrium (mM), and K is the binding constant.

A modified version of Langmuir equation (33) was also used, where P is a constant of cooperativity:

$$Q = Q_m K C_{eq}^P / (1 + K C_{eq}^P) \quad (2)$$

IN VIVO STUDY

Animals and treatment

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Québec, Canada) weighing 170-180 g were randomly divided into 3 groups of 5-8 animals each and placed individually in metabolic cages. Animals were maintained under constant temperature (22°C) and lighting (7 pm to 7 am darkness) with free access to a semi-synthetic diet (AIN-76A) and water *ad libitum*.

Group 1 was given OTA a single OTA dose of 5mg/Kg body weight per os. The toxin was produced as described before (12), then dissolved in a solution of NaHCO₃ plus 10% ethanol.

Group 2 was subjected to bile duct cannulation under sodium pentobarbital anesthesia (55 mg/Kg bw, intraperitoneally). The enterohepatic circulation was interrupted for 6 hours and immediately after rats received OTA as in group 1. The 6 h period was sufficient to deplete significantly the bile salt biliary pool (total bile salt secretion rate in bile decreased to 13 ± 1 nmol/min/g liver from a value of 38 ± 3 in animals with intact enterohepatic circulation).

Group 3 was subjected to sham surgery to control for the stress of bile duct cannulation and after 6 hours given OTA as in group 1. Blood was drawn from the retro-orbital sinus at 1 and 3 hours after OTA administration and from the abdominal aorta at 8 hours after gavage. OTA concentrations were determined by high performance liquid chromatography, as described before (12).

RESULTS

In vitro studies

All binding experiments were conducted in aqueous solution of NaHCO_3 (0.1 N), under ambient temperature. Under these conditions, the pH of the system before and after equilibration with CHA was constant and essentially independent of the initial concentration of the sorbate. TCA and TDC were used as they are the predominant primary and secondary bile salts in rats.

Binding experiments

The sorption isotherms describing the binding of OTA and bile salts anions to CHA were plotted in the form of Q (mmol of OTA or bile salts bound per gram of resin) as a function of C_{eq} (Concentration of sorbate remaining in solution at equilibrium). The results, shown in Figure 1, indicate that both OTA and bile salts were sorbed by CHA. The curves showed a tendency to reach a plateau at high C_{eq} values, indicating that the system is approaching a plateau of optimum binding of CHA for OTA or bile salts anions. CHA binds to the sorbates in the order $\text{OTA} > \text{TDC} > \text{TCA}$. The constants (K) and (Q) respectively for affinity and capacity in equation 1 are listed in Table 1. The resin exhibits a very high affinity for OTA and the dihydroxy bile acid (TDC). At an initial concentration of 1 mM, 96% of OTA and 80% of TDC were bound by CHA, but only 50% of TCA was bound by CHA. However, the capacity of binding (Q) was greater for bile salts than for OTA, and the saturation point was reached at higher levels for TCA and TDC (3.67 mmol/g resin and 3.71 mmol/g resin respectively) than for OTA (2.85 mmol/g resin).

Effect of the addition of NaCl

Table 2 illustrates the effect of increasing amounts of NaCl on bile salts and OTA binding to CHA. As expected, TCA binding was significantly reduced at a low concentration of chloride (50 mM). Binding values changed very little beyond NaCl concentrations of 100-200 mM. OTA and TDC were less affected by the addition of NaCl. The reduction in the binding was seen only at high salt concentrations (> 150 mM).

Interaction between OTA and TCA

Table 3 shows the effect of the binding of OTA by CHA in the presence of TCA, the main bile acid in rats. The OTA/TCA ratio was kept constant at 1, while the concentration was varied. In the presence of OTA, the percentage of TCA bound decreased. The amount of TCA bound (in the presence and absence of OTA) decreased, respectively, from 0.57 ± 0.03 mmol/g resin to 0.42 ± 0.08 mmol/g resin at 1 mM and from 3.24 ± 0.16 mmol/g resin to 1.09 ± 0.05 mmol/g resin at 5 mM. The percentage of decrease compared to the control (without OTA) was 26% and 66% at 1mM and 5 mM, respectively. OTA was less affected by competing anions than TCA, decreasing by 15 and 45% at 3 and 5 mM compared to the control (without TCA).

Figure 2 shows the effect of OTA on the binding of TCA by CHA in which the concentration of OTA was held constant, while the concentration of TCA was varied. The addition of OTA to the incubation system decreased the amount of TCA bound by CHA by about 40% at a TCA/OTA ratio of 1/2. The effect on TCA binding with increasing concentrations of TCA diminished, with the percentage of decrease being less than 20% at a ratio above 2. The addition of TCA did not affect the sorption of OTA by CHA. At a ratio TCA/OTA less than 2, the percentage of the decrease was about 7%, while it was 14% at a ratio of 3 (results not shown).

A decrease in the affinity (K) and capacity (Q) of TCA for CHA was observed in the presence of OTA. Constants K and Q decreased from 0.94 to 0.28 and from 3.81 to 2.99 for TCA and TCA + OTA, respectively (Table 1).

In vivo study

Effect of bile salt enterohepatic circulation on OTA plasma levels

Table 4 shows the effects of interrupting the bile salt enterohepatic circulation (by implanting a biliary fistula) for 6 hours on OTA concentrations in plasma up to 8 hours after its administration. Longer time periods could not be studied since biliary fistula rats had significantly lower food intake than animals with intact enterohepatic circulation, this being a confounding factor in the modulation of OTA blood levels. Animals given OTA with an enterohepatic circulation exhibited high OTA concentrations 1 hour after its administration; levels reached a maximum at 3 hours, decreasing slightly after 8 hours. Rats given only the solvent of the toxin had undetectable OTA in plasma (results not shown). The interruption of the enterohepatic circulation resulted in a statistically significant reduction of the OTA plasma concentrations after 1 and 3 hours of administration. By 8 hours, concentrations were not significantly different from controls. In sham-operated rats, OTA plasma levels did not differ significantly from controls (group 1).

DISCUSSION

The present study clearly shows *in vitro* that CHA has the ability to bind OTA. This may partly account for the efficacy of the resin to inhibit mycotoxin toxicity *in vivo* (12,19). Thus, the addition of the resin to mycotoxin-contaminated food may be a means of preventing OTA-associated with health problems. CHA has a strong affinity for bile salts, and has been shown to bind many drugs and toxins (8, 19, 30). We conducted tests comparing the ability of the resin to bind OTA and two normally occurring bile salts, TCA and TDC. As shown in Figure 1, CHA binds OTA and TDC with higher affinity than TCA, which may be attributed to their greater lipophilicity and stronger association with the sequestrant. Two isotherms (OTA and TDC) in Figure 1 can be fitted to the Langmuir equation (equation 1). The K values for OTA and TDC are higher than for TCA indicating a better affinity of OTA and TDC for CHA. However, the saturation of the resin was reached at slightly higher levels with bile acids (3.67 mmol/ g resin for TCA, 3.71 mmol/ g resin for TDC versus 2.85 mmol/ g resin for OTA). The binding of TCA to CHA (Fig.1) shows a sigmoidal binding isotherm that is typical of cooperative bindings (7). Therefore, a modified version of Langmuir equation was used. In the ideal case, $p=1$, meaning the cooperative effect is not important, and equation 2 becomes equation 1. A value of p greater than unity indicates an improved binding affinity at higher concentrations of the sorbate (Table 1). The binding results confirm previous work (34) on the importance of hydrophobic interactions in the binding affinity with CHA. However, this binding process appears to be a cooperative one, involving different types of interactions rather than an independent event.

The experiment on the effect of adding sodium chloride on OTA binding by the resin provides some information on the nature of the binding process. Also, because chloride is one of the predominant anions in the gastrointestinal tract, the study may have physiological significance, as competition between chloride and bile salt anions for binding sites on CHA may occur. The results show that binding of OTA was affected only with high sodium chloride concentrations. Similarly, the

binding of TDC was only slightly influenced, while that of TCA, a more hydrophilic bile salt, was markedly influenced at all concentrations of sodium chloride examined. These results agree with those of Johns and Bates (10), employing physiological concentrations of sodium chloride (150 mM). The present data suggest that, as with bile salts, a primary electrostatic interaction may occur between anionic carboxyl groups of OTA and cationic quaternary ammonium group of the resin. These interactions, however, are also reinforced by non-electrostatic binding forces between hydrophobic portions of the mycotoxin and the sequestrant molecule.

Sequential competitive studies as shown in Table 3 demonstrate that CHA binds OTA more than TCA. In the presence of 2 mM of OTA (Fig. 2), the affinity and capacity constants of CHA for TCA decreased (Table 1). However, the presence of TCA did not affect the amount of OTA bound by CHA. The preferential binding may be affected by the nature of their interaction. The binding of OTA involves mainly ion-exchange and hydrophobic sorption, while that of TCA is primarily electrostatic. This finding may be relevant to our previous *in vivo* study that showed that biliary bile salt output in rats fed diets containing OTA and CHA was higher than in rats fed the resin alone, suggesting interactions between the two molecules affecting bile salt secretory rate (12).

The results of the *in vivo* study shown in Table 4 established the role of bile salts in OTA absorption because the toxin's plasma levels (bioavailability) at 1 and 3 h after OTA administration were significantly decreased in bile salt-depleted rats. Thus, alteration of the biliary bile salt pool and OTA enterohepatic circulation may be an additional mechanism of the resin's action against mycotoxin toxicity. This observation is supported by the research of Roth *et al.* (29) with mice and Xiao *et al.* (32) with sheep.

In conclusion, The present findings clearly show that CHA is a toxin binder that may be relevant not only to treatment of humans that consumed OTA-contaminated food but also that are afflicted by other biological toxins.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by strategic grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors thank Mr. Maurice Audet for his expert technical assistance.

REFERENCES

- 1 Carey, M.C. (1983) Measurement of the physical-chemical properties of bile salt solutions, p 19-56. *In* L. Barbara (ed.), Bile acid in gastroenterology, MTP Press, Boston, MA.
- 2 Creppy, E.E., A.M. Betbeder, A. Gharbi, J. Counord, M. Castegnaro, H. Bartsch, P. Moncharmont, B. Fouillet, P. Chambon, and G. Dirheimer. 1991. Human ochratoxicosis in France. p. 145-151. *In* M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (ed), Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon, France.
- 3 Creppy, E.E., A. Kane, G. Dirheimer, C. Lafarge-Frayssinet, S. Mousset, and C. Frayssinet. 1985. Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.* 28: 29-35.
- 4 Creppy, E.E., F.C. Stormer, R. Rosenthaler, and G. Dieheimer. 1983. Effects of two metabolites of ochratoxin A, [4R]-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin, on the immune response in mice. *Infect. Immunol.* 39: 1015-1018.
- 5 De Scott, B. (1965) Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 25: 213-222.
- 6 Frisvad, J.C. and R.A. Samson. 1991. Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. p.441-476. *In* J. Chelkowski (ed), Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Elsevier, Amsterdam.

- 7 Galley, W.C., M. Bouvier, S.D. Clas, G.R. Brown, and L.E. St-Pierre. 1988. A simplified analysis of scatchard plots for systems with two interacting binding sites. *Biopolymers*. 27: 79-86.
- 8 Gallo, D.G., K.R. Bailey, and A.L. Sheffner. 1965. The interaction between cholestyramine and drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 60-65.
- 9 Gordon, A. and M. Roberts. 1980. Ion Exchangers and their clinical applications. p 249-273. *In* C. Giordano (ed), *Sorbents and their clinical applications*, Academic Press, Inc., New York; Toronto.
- 10 Johns, W.H. and T.R. Bates. 1969. Quantification of the binding tendencies of cholestyramine I: effect of structure and added electrolytes on the binding of unconjugated and conjugated bile salt anions. *J. Pharm. Sci.* 58: 179-183.
- 11 Kanisawa, M. and S. Suzuki. 1978. Induction of renal and hepatic tumours in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann* 69: 599-600.
- 12 Kerkadi, A., C. Barriault, A.A. Frohlich, R.R. Marquardt, G. Bouchard, I.M. Yousef, and B. Tuchweber. 1998. Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. *J. Toxicol. Environ. Health.* 53: 231-250.
- 13 Krogh, P. (1987) Ochratoxin A in food. P. 97-121. *In* P. Krogh (ed), *Mycotoxins in Food.*, Academic Press, New York.
- 14 Krogh, P., N.H Axelsen, F. Elling, N. Gyrd-Hansen, B. Hald, J. Hyldgaard-Jensen, A.E. Iarsen, A. Madsen, H.P. Mortensen, T. Moller, O.K. Petersen, U. Ravnskov, M. Rostgaard, and O. Aalund. 1974. Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* 246: 1-21.

- 15 Krogh, P., F. Elling, B. Hald, A. E. Iarsen, E.B. Lillehoj, A. Madsen, H.P. Mortensen, F. Rasmussen, and U. Ravnskov. 1979. Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Vet. Pathol.* 16: 466-475.
- 16 Kuiper-Goodman, T. and P.M. Scott. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.
- 17 Lea, T., K. Steien, and F.C. Stormer. 1989. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 107: 153-159.
- 18 Maaroufi, K., A. Achour, A.M. Betbeder, M. Hammami, F. Ellouz, E.E. Creppy, and H. Bacha. 1995. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch. Toxicol.* 69: 552-558.
- 19 Madhyastha, M.S., A.A. Frohlich, and R.R. Marquardt. 1992. Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.* 30: 709-714.
- 20 Marquardt, R.R. and A.A. Frohlich. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.* 70: 3968-3988.
- 21 Marquardt, R.R., A.A. Frohlich, and D. Abramson. 1990. Ochratoxin A: an important western Canadian storage mycotoxin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 991-999.
- 22 Mayura, K., R. Parker, W.O. Berndt, and T.D. Phillips. 1984. Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: partial protection by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1186-1188.

- 23 Mullan, N.A., M.N. Burgess, R.J. Bywater, and P.M. Newsome. 1979. The ability of cholestyramine resin and other adsorbents to bind *Escherichia Coli* enterotoxins. *J. Med. Microbiol.* 12: 487-496.
- 24 NTP (1989) Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (gavage studies). *In* G. Boorman (ed), National Institute of Health Publication No. 89-2813, US department of Health and Human Resources, Research Triangle Park, NC, US.
- 25 Petkova-Bocharova, T., I.N. Chernozemsky, and M.Castegnaro. 1988. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food addi. Contam.* 5: 299-301.
- 26 Pfohl-Leskowicz, A., K. Chakor, E.E. Creppy, and G. Dirheimer. 1991. DNA-adduct formation in mice treated with ochratoxin A. p. 245-253. *In* M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (eds), *Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours.* No. 115, IARC Scientific Publications, Lyon, France.
- 27 Polli, J.E. and G.L. Amidon. 1995. In vitro characterization of sodium glycocholate binding to cholestyramine resin. *J. Pharmacol. Sci.* 84: 55-61.
- 28 Ramos, A.J., J. Fink-Gremmels, and E. Hernandez. 1996. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbents compounds. *J. Food. Prot.* 59: 631-641.
- 29 Roth, A., K. Chakor., E.E. Creppy., A. Kane., R. Roschenthaler, and G. Dirheimer. 1988 Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *J. Toxicol.* 48: 293-308.

30 Saral, R. and J.L. Spratt. 1967. Alteration of oral digitoxin toxicity and its in vitro binding by cholestyramine. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therapie.* 167: 10-18.

31 Underhill, K.L., B.A. Rotter, B.K. Thompson, D.B. Prelusky, and H.L. Trenholm 1995. Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 128-134.

32 Xiao, H., R.P. Marquardt, A.A. Frohlich, G.D. Phillips, and T.G. Vitti. 1991 Effect of hay and a grain diet on the bioavailability of ochratoxin A in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 69: 3715-3723.

33 Zhu, X.X., F. Brizard, J. Piché, C.T. Yim, and G.R. Brown. 1998. Binding of bile salts with cholestyramine and a functionalized polyacrylamide resin. *Langmuir*, in press.

34 Zhu, X.X., G.R. Brown, and L.F. St-Pierre. 1992. Polymeric sorbents for bile acids. I: comparison between cholestyramine and colestipol. *J. Pharm. Sci.* 81: 65-69.

Table 1: **Maximum binding capacity (Q), binding constants (K) and constants of cooperativity (P) for OTA and bile salts ^a.**

Agents bound by CHA	Q (mmol/g)	K (10³ M⁻¹)	P
OTA	2.85	37.5	1
TDC	3.71	6.19	1
TCA	3.67	1.02	2.84
TCA	3.81	0.94	2.57
TCA + OTA^b	2.99	0.28	2.96

^a The Langmuir equation that was used in the calculation of Q, K and P is described in the Material and Methods.

^b values are the constants for TCA.

Table 2: **Effect of NaCl on the sorption of OTA, TCA and TDC by CHA ^a.**

NaCl (mM)	mmol OTA ^b bound/ g resin	mmol TCA ^c bound/ g resin	mmol TDC ^c bound/ g resin
0	1.503 ± 0.079	1.630 ± 0.056	1.475 ± 0.039
50	1.455 ± 0.064	1.012 ± 0.035*	1.413 ± 0.107
100	1.432 ± 0.051	1.007 ± 0.139*	1.362 ± 0.058
150	1.275 ± 0.071*	0.948 ± 0.115*	1.223 ± 0.176
200	1.200 ± 0.112*	0.928 ± 0.134*	1.067 ± 0.121*

^a Results are expressed as the mean ± SEM (n= 3 x 2).* Denotes significant difference when compared to control (NaCl=0) P<0.05.

^b Initial concentration of OTA was 2 mM.

^c Initial concentration of bile salts was 3 mM.

Table 3: **Binding of OTA and TCA when present singly or in combination with CHA** ^a.

OTA and TCA concentration	mmol OTA^b bound/ g resin (% sorbed)	mmol TCA^b bound / g resin (% sorbed)
1 mM OTA	0.96 ± 0.01(96)	
1mM TCA		0.57 ± 0.03 (55)
OTA/TCA ^b	0.96 ± 0.02 (96)	0.42 ± 0.08 (45)
3 mM OTA	2.29 ± 0.11 (77)	
3 mM TCA		1.50 ± 0.16 (60)
OTA/TCA	1.95 ± 0.15 (68)	1.29 ± 0.03 (45)
5 mM OTA	2.85 ± 0.18 (57)	
5 mM TCA		3.24 ± 0.16 (65)
OTA/TCA	1.57 ± 0.20 (31)	1.09 ± 0.05 (23)

^a Results are expressed as M±SE (n=3 X 2).

^b Initial concentrations of OTA and TCA were 1, 3 and 5 mM while the OTA/TCA ratio=1

Table 4: **Influence of biliary bile acids on plasma OTA concentrations after a single oral dose of OTA**^a

Groups	Plasma OTA ($\mu\text{g/ml}$) at following times		
	1 h	3 h	8 h
Control	4.8 ± 1.3	7.9 ± 2.1	6.2 ± 1.0
Sham-operated	7.8 ± 1.3	7.9 ± 0.9	5.1 ± 0.4
Bile duct fistula ^b	$3.8 \pm 0.7^{**c}$	$3.1 \pm 0.5^{*c,d}$	4.6 ± 0.5

^a Results are expressed as the mean \pm SEM (n=5-8). * $p < 0.05$. ** $p < 0.001$

^b Enterohepatic circulation was interrupted for 6 hours.

^c Significantly different from Sham-operated; ^d Significantly different from control OTA (5 mg/kg) given by gavage.

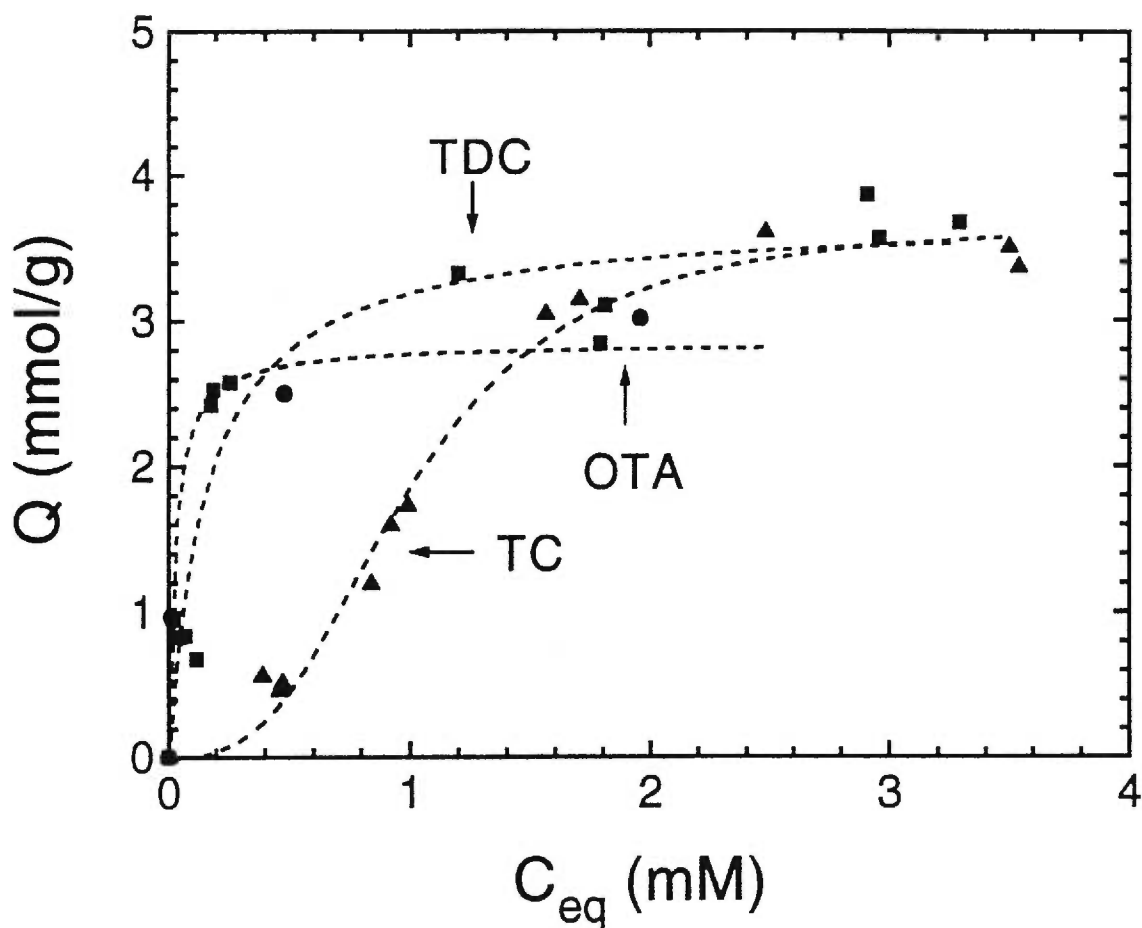


Figure 1: Isotherms for the binding of OTA and bile salts (TCA and TDC) from NaHCO_3 solution at ambient temperature by CHA. The bound amount of OTA and bile salt (mmol) per gram of the resin (Q) is plotted as a function of the equilibrium concentration of OTA and bile salt (C_{eq}): Circles, OTA; Squares, TDC; Triangles, TCA. Dashed lines are fittings to equation 1 (for OTA and TDC) and to equation 2 (for TCA)

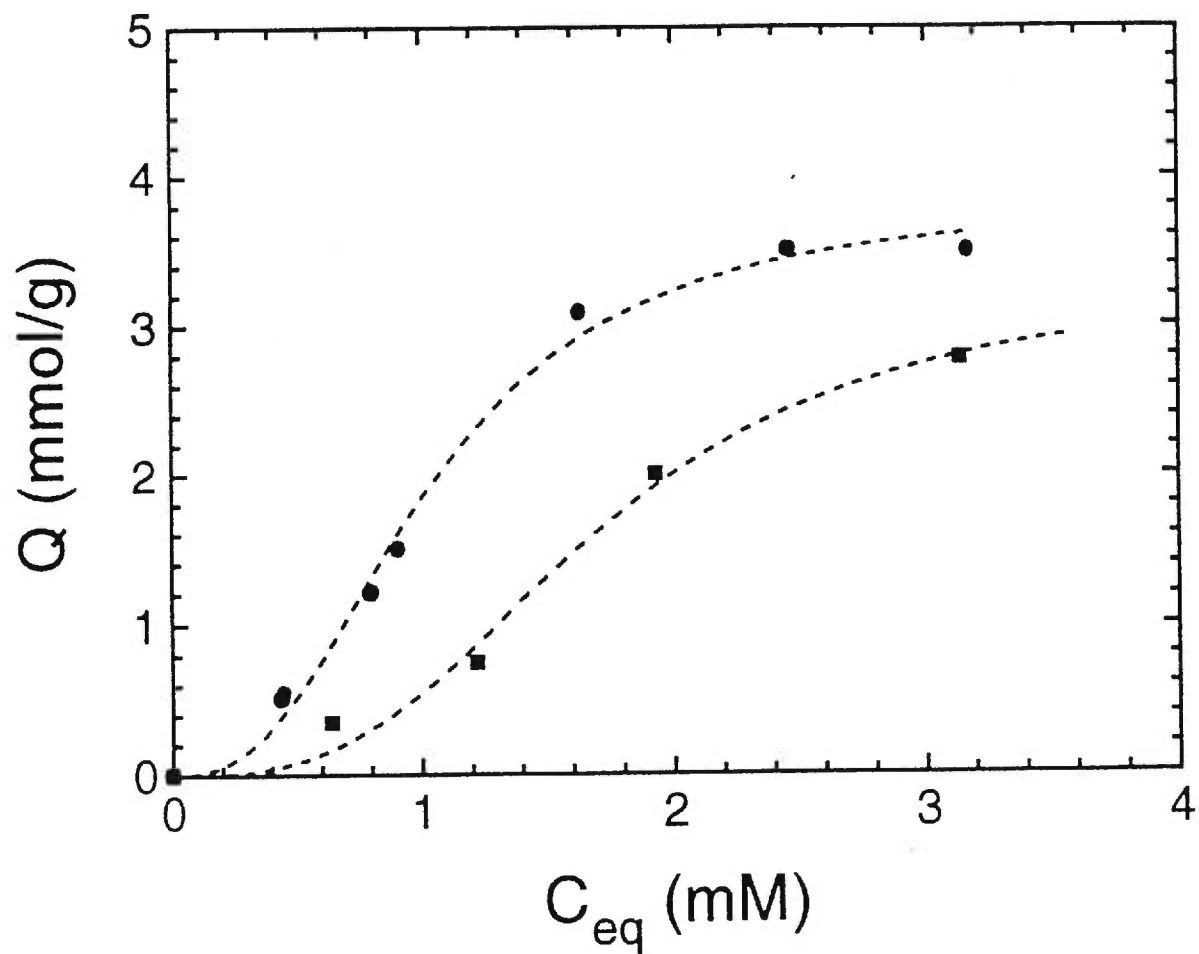


Figure 2: Effect of OTA on the binding of TCA from NaHCO_3 solution at ambient temperature by CHA. The amount of bound of TCA (mmol) per gram of the resin (Q) is plotted as a function of the equilibrium concentration (C_{eq}): Circles, TCA; Squares, TCA + OTA. Dashed lines are fittings to equation 2.

Chapitre 4. Discussion générale

La contamination des produits alimentaires par les mycotoxines est un problème d'importance mondiale, tant sur le plan économique que sur le plan de la santé publique. L'organisation mondiale de l'agriculture et de l'alimentation (FAO) a estimé que 25% des récoltes mondiales sont contaminées par les mycotoxines et que ces dernières sont à l'origine de pertes économiques considérables (Charmley *et al*, 1995) à différents niveaux: la récolte, les transformations technologiques, la consommation humaine et animale, l'élevage et le commerce (CAST, 1989). L'exposition de l'homme aux mycotoxines a deux origines: une origine directe via la consommation des produits contaminés (céréales, légumineuses, café ...) et une origine indirecte par la consommation de produits alimentaires d'origine animale provenant d'animaux ayant consommé des aliments contaminés. La corrélation entre la consommation d'aliments contaminés par les mycotoxines et l'apparition de certains types de cancer ainsi que d'autres pathologies est bien documentée (IARC, 1993, IPCS, 1991). De plus, les différents traitements technologiques (conservations et transformation) ne permettent pas d'éliminer totalement les mycotoxines, et en particulier l'OTA des aliments, d'où le risque de les retrouver dans la chaîne alimentaire humaine (Scott, 1996a; 1998). Il est important de réduire ou d'éliminer la présence des mycotoxines dans les aliments. Afin de limiter la contamination, plusieurs méthodes ont été testées telles que le traitement par la chaleur, le froid, les radiations ou l'addition des substances chimiques (Scott, 1991). Toutefois, ces méthodes se sont avérées soit impraticables, coûteuses ou bien inefficaces (CAST, 1989).

C'est pour répondre aux préoccupations croissantes du secteur agricole (alimentation animale et élevage) qu'une nouvelle approche plus prometteuse a été envisagée. Elle consiste en l'utilisation de substances non nutritionnelles (adsorbants ou séquestrants) qui ont la propriété de lier les mycotoxines dans le tractus gastrointestinal, de limiter leur absorption intestinale et par ce fait, diminuer leur toxicité. Cette approche a fait l'objet de plusieurs publications récentes (Ramos

et al, 1996a; Ramos et Hernandez, 1997; Dwyer *et al*, 1997; Galvano *et al*, 1998; Kubena *et al*, 1998; Lemke *et al*, 1998; Grant *et al*, 1998). Parmi les substances testées avec diverses mycotoxines qui ont donné des résultats encourageants, on peut citer les résines synthétiques échangeuses d'ions (la cholestyramine), certaines variétés d'argile (kaolinite, montmorillonite..), de bentonite, les aluminosilicates et le charbon activé. L'addition de ces substances à l'alimentation animale contaminée s'est traduite par une diminution de la toxicité.

C'est dans ce contexte que s'intègre notre projet de recherche qui consiste à tester l'efficacité de la cholestyramine(CHA), une résine liant les acides biliaires à diminuer la toxicité induite par l'ochratoxine A (OTA) chez le rat.

4.1 Effet de l'addition de la CHA à la diète sur la toxicité induite par l'OTA chez le rat.

4.1.1 Poids corporel, ingestion alimentaire et poids du foie et des reins

Nous avons exposé des rats à des diètes contaminées par 1 et 3 ppm d'OTA. Les niveaux d'exposition retenus sont les taux de contamination fréquemment rencontrés à l'état naturel. À chaque niveau de contamination, les diètes ont été supplémentées avec de la CHA à des concentrations de 0.1; 1 et 5%. Les résultats démontrent que l'addition de l'OTA ou de la CHA isolément ou en combinaison n'a pas eu un effet sur l'ingestion alimentaire, le gain de poids, ainsi que le poids du foie et des reins.

4.1.2 Effet de l'addition de la CHA sur le métabolisme de l'OTA

4.1.2.1 Concentration de l'OTA dans le plasma

Les résultats montrent que l'addition de la CHA diminue significativement la concentration d'OTA dans le plasma. À un taux de 1 ppm d'OTA (1 mg/kg), toutes les concentrations de la CHA utilisées ont entraîné une diminution significative du niveau d'OTA plasmatique. Les taux de diminution observés étaient de 30%, 36% et 70% pour une supplémentation de 0.1, 1 et 5% respectivement (Figure 1, Article I). Par contre, à un taux de contamination de 3 ppm d'OTA, cet effet n'a été observé qu'avec une supplémentation de 5%.

Dans le but de déterminer la dose minimale efficace, nous avons testé des concentrations de CHA inférieures à 0.1% pour une exposition de 1 ppm d'OTA. Ces niveaux n'ont pas diminué significativement la concentration plasmatique en OTA ($1.6 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ versus $1.23 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$) pour le contrôle et 0.06% de CHA respectivement. Pour 3 ppm d'OTA, nous avons testé deux niveaux de supplémentation en CHA de 2.5% et 3.5%. Les résultats obtenus montrent qu'avec 2.5%, le niveau d'OTA est diminué d'une façon significative comparé au groupe contrôle. Par conséquent, les concentrations de CHA minimales efficaces sont 0.1% et 2.5% pour un taux de contamination de 1 et 3 ppm d'OTA respectivement.

D'autres travaux, notamment de Madhyastha *et al* (1992) ont aussi rapporté une baisse de l'OTA dans le plasma en présence de la CHA chez le rat. Mais, dans cette étude, une seule concentration d'OTA a été utilisée (1 ppm) et 3 niveaux de supplémentation par la CHA (0.5; 1 et 2%).

4.1.2.2 Sécrétion de l'OTA et de ses métabolites dans la bile et dans l'urine

Il est bien établi que l'OTA peut subir un cycle entérohépatique grâce à son élimination biliaire suivi d'une réabsorption intestinale. Notre étude montre que l'addition de l'OTA n'a pas entraîné un changement dans le débit biliaire. Dans les groupes recevant de l'OTA, la toxine est surtout sécrétée dans la bile sous la forme d'OTA et une très faible quantité sous la forme de métabolites (OT α et HO-OTA). Des études récentes ont montré qu'une quantité considérable d'OTA est sécrétée dans la bile sous une forme conjuguée (glucuronides et sulfates) (Kane *et al*, 1986b) qui sera hydrolysée par la flore intestinale avant sa réabsorption (Delacruz et Bach, 1990). Le taux d'OTA et des métabolites sécrétés dans la bile des rats consommant une diète contaminée par 1 ou 3 ppm d'OTA est diminué d'une façon significative par l'addition de 1% et 5% de CHA (Tableau 2, Article I).

Il est à noter que la résine seule ajoutée à la diète diminue significativement la sécrétion d'AB totaux dans la bile et augmente leur excrétion fécale. Cette observation est valable pour toutes les doses testées, ce qui est en accord avec des travaux précédents de Johns et Bates (1969) et de Clas (1991). Notons que la quantité d'AB sécrétée ($\mu\text{mole AB/jour}$) dans la bile est plus élevée dans le groupe consommant 3 ppm d'OTA et la CHA, que dans le groupe CHA isolé (Tableau 3, Article I). Ceci pourrait être dû à une compétition entre les AB et l'OTA sur des sites de liaison au niveau de la CHA.

Le volume urinaire a augmenté dans le groupe exposé à 3 ppm d'OTA par rapport au groupe contrôle (sans OTA). Il est à noter que l'augmentation du volume urinaire a été généralement rapporté avec des doses très élevées de la toxine. Contrairement à la bile et au plasma, l'OTA est surtout excrétée dans l'urine sous sa forme hydrolysée ($\text{OT}\alpha$) et à un degré moindre sous sa forme native (OTA) et hydroxylée (HO-OTA), ce qui est en accord avec les travaux de Storen *et al* (1982). En effet, ces auteurs ont montré que chez le rat, 32% à 36% de l'OTA administrée sont excrétés dans l'urine: 6% sous la forme d'OTA, 1% à 1,5% sous la forme de HO-OTA, et 25% à 27% sous forme d' $\text{OT}\alpha$. Par contre, chez les ruminants, Sreemannarayana *et al* (1988) ont rapporté que 88% de l'OTA administrée est excrété dans l'urine. La totalité de l'OTA excrétée dans l'urine est sous la forme de l' $\text{OT}\alpha$ (85%) et 3.1% sous la forme native. En effet, les ruminants ne sont pas sensibles à la toxicité de l'OTA puisqu'ils peuvent dégrader la totalité de la toxine présente dans l'alimentation. Ce qui pourrait être un moyen très efficace pour utiliser l'alimentation contaminée par l'OTA et éviter sa destruction. D'autres travaux, notamment de Ballinger *et al* (1986) et de Suzuki *et al* (1975), ont aussi montré que chez le rat, l'excrétion de l'OTA dans l'urine apparaît surtout sous la forme de l' $\text{OT}\alpha$. La formation de l' $\text{OT}\alpha$ est le plus important mécanisme qu'utilise l'organisme pour éliminer l'OTA, en plus de l'excrétion de l'OTA (Storen *et al*, 1982). Sa présence dans l'urine peut être expliquée par sa réabsorption rapide après sa formation dans l'intestin (Kumagai, 1988). L'addition de la CHA à la diète contaminée par l'OTA entraîne une diminution de l'excrétion de l'OTA et de ses métabolites ($\text{OT}\alpha$ et HO-OTA) dans l'urine (Figure2, ArticleI),

4.1.2.3 Excrétion de l'OTA et de ses métabolites dans les fèces

L'addition de la CHA (2.5 et 5%) a entraîné une augmentation significative du poids des fèces dans les groupes consommant ou non de l'OTA (Tableau 1, Article I). En plus de son élimination rénale et biliaire, l'OTA est aussi excrétée dans les fèces surtout sous la forme native. La quantité d'OTA excrétée est augmentée d'une façon significative par l'addition de la CHA. Par contre, la quantité de métabolites excrétés a diminué (Figure 3, Article I). L'augmentation de l'excrétion fécale de l'OTA devrait être accompagnée par une augmentation de la formation de l'OT α par la flore microbienne. Or les résultats obtenus montrent que la quantité d'OT α excrétée est très faible, ce qui peut être attribuée à un temps de transit intestinal très court (dû à la présence de la résine) et/ou à une diminution de l'exposition de la toxine à la flore bactérienne intestinale (liaison de l'OTA avec la CHA) et à une modification de la flore bactérienne (Burkhardt *et al*, 1998).

4.1.3 Enzymurie, fonction rénale et morphologie

Dans le but d'examiner l'effet néphrotoxique de l'OTA et de voir le possible rôle protecteur de la CHA, nous avons mesuré l'activité de deux marqueurs enzymatiques, la γ GT et le NAG. L'utilisation de l'enzymurie comme un indicateur de lésions rénales est une méthode plus sensible et moins invasive que les tests fonctionnels rénaux ou histologiques (Braun *et al*, 1978; Price, 1992). Les enzymes examinées ont aussi été trouvées en quantités élevées dans l'urine des rats traités avec d'autres substances néphrotoxiques telles que le chlorure mercurique (Braun *et al*, 1978).

Pour examiner l'effet de la CHA sur la néphrotoxicité, nous avons utilisé 3 ppm d'OTA et 5% de CHA. Ce choix est basé sur une étude pilote qui a montré qu'une concentration d'1 ppm d'OTA n'a pas entraîné une atteinte rénale importante, alors qu'une concentration de 3 ppm a causé des dommages significatifs au niveau rénal.

Les résultats montrent qu'un traitement de deux semaines par l'OTA entraîne une élévation significative de l'enzymurie, si l'on compare au groupe contrôle (sans OTA). Après une semaine de traitement, l'activité de la γ GT a augmenté de plus de 90%, ce qui n'est pas le cas pour le NAG où l'activité est restée stable. Une augmentation de l'activité de NAG (60%) n'a été observée qu'au cours de la 2^{ème} semaine (Figure 4, Article I). L'élévation de l'activité de ces deux enzymes témoigne de lésions tubulaires proximales. La précocité de l'élévation de l'activité de la γ GT (enzyme membranaire de la bordure en brosse) suggère que la membrane plasmique semble être la première cible de l'effet néphrotoxique de l'OTA. D'autres travaux utilisant des doses de l'ordre de 2 ppm ont aussi rapporté des observations similaires (Kane *et al*, 1986a; Baudrimont *et al*, 1994, 1995; Creppy *et al*, 1996). En effet, dans l'étude de Kane *et al* (1986a), l'OTA a été donnée par gavage (145 μ g/kg de PC /jour pendant 8 à 12 semaines). Ils avaient aussi trouvé une augmentation des enzymes urinaires (γ GT, phosphatase alcaline, leucine aminopeptidase) (enzymes de la bordure en brosse) dès la 1^{ère} semaine. L'activité de la NAG et de la lactate déhydrogénase (enzymes du cytoplasme) n'a été augmentée qu'à partir de la 2^{ème} semaine. Ces auteurs ont aussi démontré une diminution significative de ces enzymes dans les fractions de tubules isolées à partir du cortex rénal. Ils ont aussi observé une accumulation du PAH. Nos travaux démontrent que l'addition de la CHA à une diète contaminée par l'OTA entraîne un abaissement significatif de l'activité de la γ GT et de la NAG (valeurs se rapprochant de celles des témoins) si l'on compare avec le groupe OTA seul. Ces résultats corroborent nos observations histologiques. En effet, l'examen microscopique montre une atteinte rénale localisée dans les tubules proximaux chez le groupe consommant une diète contaminée par 3 ppm d'OTA (Figure 5A, Article 1). Dans le groupe recevant de la CHA, une morphologie normale du rein a été observée (Figure 5B, Article I).

Concernant la fonction rénale, l'OTA a provoqué une diminution significative de la créatininurie si l'on compare au groupe contrôle (sans OTA). Des observations similaires utilisant des doses d'OTA différentes ont été rapportées par Kane *et al* (1986a), Baudrimont *et al* (1994; 1995). En présence de la CHA, la quantité de créatinine excrétée dans l'urine est augmentée par rapport au groupe OTA (Tableau 4, Article I).

Notre travail confirme l'effet néphrotoxique de l'OTA à une dose très faible qui pourrait se trouver dans les aliments destinés aux animaux. Ceci souligne l'importance d'éliminer la toxine des aliments afin d'éviter des lésions rénales et leurs conséquences sur la santé des animaux d'élevage et éventuellement, chez l'être humain.

Cette étude démontre clairement l'efficacité de la CHA pour diminuer la concentration de l'OTA dans le plasma, l'urine et la bile et à augmenter son excrétion fécale. Cette diminution est associée avec une meilleure protection contre la néphrotoxicité évaluée par les enzymes urinaires (γ GT et NAG) ainsi que par l'examen histologique.

Pour élucider les mécanismes par lesquels la CHA protège contre la toxicité induite par l'OTA nous proposons deux hypothèses: soit par un mécanisme direct dû à une liaison de la toxine avec la résine dans le tractus gastro-intestinal et une augmentation de son excrétion par les fèces, soit par un mécanisme indirect via le pool des AB.

En effet, l'OTA présente une certaine similitude avec certains AB au niveau de la structure chimique et du poids moléculaire. Donc, les deux molécules pourraient réagir de la même manière à la présence de la CHA. L'OTA possède deux groupements ioniques à savoir, le groupement carboxylique de la phénylalanine et le groupement hydroxyle. Au niveau de la partie proximale du tractus gastro-intestinal, l'OTA se trouve chargée négativement, d'où la possible liaison ionique avec la CHA. Ainsi, les charges négatives de l'OTA pourront se lier aux charges positives de la CHA.

Un autre mécanisme possible est celui relatif à l'altération du pool des AB et/ou l'interruption de la circulation entérohépatique de l'OTA. Il est bien connu que les AB, surfactants physiologiques, jouent un rôle important dans l'absorption intestinale des lipides et des substances liposolubles (Miyazaki *et al*, 1979). En solution aqueuse, les AB forment des agrégats connus sous le nom de micelles simples. Ces

dernières jouent un rôle important dans l'émulsification, la solubilisation et l'absorption du cholestérol, des lipides, des vitamines lipo-solubles, du fer ainsi que des médicaments (Xiaohong *et al*, 1997, Sanyal *et al*, 1994, Yamamoto *et al*, 1996, Kimura *et al*, 1985). Les AB peuvent influencer l'absorption des xénobiotiques (médicaments) en solution par un effet sur la perméabilité membranaire. Il faut aussi noter que la solubilité et le taux de dissolution des médicaments sont étroitement liés à la présence des AB (Poelma *et al*, 1990). Comme l'OTA est surtout absorbée sous sa forme non-ionique liposoluble, il est très probable que cette absorption nécessite la présence des AB. Le rôle majeur de la CHA réside dans le fait qu'elle lie les AB dans l'intestin, qu'elle interrompe leur circulation entérohépatique et qu'elle augmente leur excrétion fécale (Polli et Amidon, 1995). Par ce fait, elle diminue la quantité d'AB disponible dans l'intestin, ce qui pourrait altérer l'absorption de l'OTA. Ces deux mécanismes ont fait l'objet d'une étude qui sera décrite dans les prochaines sections de ce chapitre.

4.2 Liaison de l'OTA avec la CHA

L'objectif de cette étude était d'établir si la CHA pouvait se lier à l'OTA et le cas échéant, de caractériser cette liaison. À cette fin, nous avons mené une série d'études *in vitro* de sorption. Étant donné que la CHA lie les AB, nous avons comparé la liaison possible de la CHA avec l'OTA, ainsi que celle de deux acides biliaires normalement présents chez le rat (le taurocholate TCA: AB primaire hydrophile et le taurodéoxycholate TDC: AB secondaire hydrophobe).

4.2.1 Les études de sorption

Les résultats obtenus montrent que la CHA lie aussi bien l'OTA que les AB (Figure 1, Article II). Il est à noter qu'à fortes concentrations, les courbes tendent à atteindre un plateau, indiquant ainsi que le système approche la capacité maximale de liaison de l'OTA et des AB. La CHA a une plus grande affinité à lier l'OTA et le

taurodéoxycholate que le taurocholate. À une concentration initiale de 1 mM, 96% de l'OTA et 80% du TDC sont liés à la résine, alors que seulement 50% sont liés pour le TCA. Dans le but de déterminer les constantes d'affinité (K) et la capacité maximale (Q) de liaison, nous avons eu recours à l'équation de Langmuir. Les constantes d'affinité (K) sont de 37.5 et 6.19 pour l'OTA et le TDC respectivement, alors qu'elle n'est que de 1.02 pour le TCA (Tableau 3, Article II). L'OTA et le TDC sont plus lipophiles que le TCA et par ce fait, ils sont fortement séquestrés par la résine. Les résultats de la liaison des AB avec la CHA correspondent à ceux de Benson *et al*, (1993) et de Hagerman *et al* (1973). Par contre, la capacité (Q) de liaison des AB est plus élevée que celle de l'OTA. Elle est de 3.71 mmole/g pour le TDC, 3.67 mmole/g résine pour le TCA, et de 2.85 mmole/g pour l'OTA.

La CHA a été aussi utilisée dans des études *in vitro* avec une autre mycotoxine. Ainsi Ramos *et al* (1996b) ont étudié la séquestration de la zéaralénone (mycotoxine responsable de l'avortement chez les animaux d'élevage) par différentes substances absorbantes incluant la CHA. Ils ont montré que la CHA a une plus grande capacité à lier la zéaralénone si l'on compare aux autres substances testées (différentes sortes d'argile). Ils ont rapporté que 1% de CHA pouvait lier 100% de la toxine avec une capacité de 1.76-2.0 mg de zéaralénone/ g résine).

La liaison de l'OTA par d'autres séquestrants, autre que la CHA, a fait l'objet de plusieurs études. Rotter *et al* (1989b) ont étudié *in vitro* la liaison de l'OTA par le charbon activé (CA). Ils ont utilisé 3 µg OTA/ mg de CA, et ont rapporté un taux de liaison de 90% correspondant à une saturation de 2.7 µg OTA/ mg CA. En dépit de cette forte liaison *in vitro*, les études *in vivo* ont montré que ce séquestrant, même à de fortes concentrations, est inefficace à diminuer la toxicité de l'OTA chez les poules. Dans une autre étude, Galvano *et al* (1998) ont aussi étudié l'efficacité du CA à lier l'OTA et le déoxynivalénone (vomitoxine). Le CA utilisé dans cette étude a été obtenu par des procédés chimiques d'activation à partir de résidus de noyaux d'olives, de pêches et d'amandes. Les résultats obtenus ont montré une capacité de liaison avec l'OTA variant de 0.8 à 99.8% selon l'origine du carbone. Avec un ratio OTA/sorbent de 125 µg OTA/ mg de séquestrant, ils ont rapporté une capacité de

saturation de 80-121 μg OTA/ mg AC (soit 0.20-0.30 mmole OTA/ g de résine). En ce qui concerne la déoxynivalénone, la saturation est de 2.0 μg déoxynivalénone/mg AC.

Notons finalement que la grande différence de capacité du CA à lier l'OTA entre les deux études pourrait être due à l'origine du carbone et au procédé d'activation.

La séquestration de l'aflatoxine et de la zéaralénone par certaines classes d'argile a fait aussi l'objet d'autres études. Ainsi Grant et Phillips (1998) ont montré que l'aluminosilicate de calcium et de sodium a une grande affinité à lier l'aflatoxine B₁. La capacité maximale de liaison est de 0.336 mmole/ g de résine. Ces études corroborent bien les travaux *in vivo* menés par la même équipe. En effet, Huff *et al* (1992) ont rapporté l'efficacité de l'aluminosilicate à diminuer la toxicité induite par l'aflatoxine B₁ chez le poulet. Par contre, son utilisation visant à protéger contre la toxicité de l'OTA seule ou en combinaison avec l'aflatoxine n'a pas donné les résultats escomptés. Il est à noter que la capacité de l'aluminosilicate à lier l'OTA est beaucoup plus faible par rapport à l'aflatoxine (1.3 μg OTA/ mg soit 0.004 mmole/ g) (Galvano *et al*, 1998). Kubena *et al* (1998) ont aussi montré l'inefficacité de l'aluminosilicate à protéger les poulets contre un autre type de mycotoxine T₂.

La sorption de la zéaralénone par la montmorillonite (phyllosilicate) modifiée par l'addition d'anions organiques dans le but d'augmenter son hydrophobicité a été aussi étudiée. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la sorption en fonction du degré d'hydrophobicité des différentes montmorillonites testées. La capacité de liaison maximale est de 0.39 mmole/g (Lemke *et al*, 1998).

À la lumière des résultats obtenus, il apparaît clairement que le sorbent ayant fait preuve de la meilleure capacité à lier l'OTA est la CHA. Il faut noter que l'addition de la CHA à la diète ne pose pas de problème pratique, ce qui n'est pas le cas du charbon activé. En effet, la coloration noire des aliments par ces dernières substances est à l'origine de la diminution de l'ingestion alimentaire de la diète supplémentée avec ces substances (Rotter *et al*, 1989b; Ramos *et al*, 1996a). Un autre point à soulever est relatif au prix de production du charbon activé qui est très

élevé (Galvano *et al*, 1998). Soulignons également le manque d'études *in vivo* menées avec le charbon activé et l'OTA afin de comparer son efficacité avec celle de la CHA.

4.2.2 Effet de l'addition du NaCl sur la liaison de l'OTA et les AB avec la CHA.

Une fois administrée par voie orale, la CHA traverse une portion importante du tractus gastro-intestinal avant d'atteindre l'intestin grêle où les anions de l'OTA et des sels biliaires sont présents. Durant ce trajet, la CHA serait exposée à différents anions, l'ion chlorure est le plus abondant des anions présents dans le tractus gastro-intestinal et il est omniprésent le long de l'intestin. L'étude de l'effet de l'addition du NaCl sur la liaison de l'OTA par la CHA permet de caractériser la nature de la liaison et d'essayer d'extrapoler les résultats *in vitro* à la condition physiologique. Les résultats montrent que la sorption de l'OTA par la CHA n'est affectée qu'à de fortes concentrations de NaCl. Il est à noter aussi que le TDC est très peu sensible à l'addition de NaCl. Johns et Bates (1969) ont aussi trouvé que la sorption du déoxycholate et du glycodéoxycholate n'est pas diminuée par la présence de NaCl à une concentration (< 150 mM). Cette étude suggère la présence de deux types de liaison, l'une électrostatique (entre les anions du groupement carboxylique de l'OTA et du TDC avec les cations de l'ammonium quaternaire de la résine) et l'autre non-électrostatique hydrophobe. Cette dernière liaison impliquerait les parties hydrophobes de la toxine et du sel biliaire avec les molécules de la résine. Par contre, l'addition de NaCl au système réduit significativement la quantité de TCA liée à la CHA (Tableau 1, Article II). Cette réduction est surtout attribuée à l'existence d'une compétition entre le chlorure et l'acide biliaire pour le site de liaison sur la résine. Cet effet est aussi lié à la non-spécificité de la liaison électrostatique impliquée dans cette adsorption (Luner et Amidon, 1992). Johns et Bates (1969) ont aussi rapporté que l'addition de l'ion chlorure à une solution de sels biliaires réduit considérablement le taux de trihydroxy acide biliaire lié à la résine. Des résultats similaires ont été obtenus avec le

glycocholate (Burt *et al*, 1987). Nos résultats concordent bien avec ces observations. L'affinité de la résine à lier les acides biliaires diminue avec le nombre de groupements hydroxyles (Lindenbaum and Higuchi, 1975; Wu *et al*, 1996). Il faut noter que le processus de liaison est un processus de coopération faisant intervenir différents types d'interactions, rarement un seul type d'interaction (Zhu *et al*, 1992),

La liaison impliquée est de type électrostatique renforcée par des liaisons hydrophobes. Le même type de liaison a été rapporté pour la zéaralénone et la montmorillonite (Lemke *et al*, 1998). Par contre, la liaison entre l'aflatoxine B₁ et l'aluminosilicate est seulement de type électrostatique (entre le groupement c=O de la toxine et les ions métalliques de l'aluminosilicate) (Grant et Phillips, 1998).

4.2.3 L'étude de l'interaction entre l'OTA et le TCA pour la liaison avec la CHA

Nous avons mis dans un même système les deux substances OTA et TCA dans le but de déterminer s'il y aurait une compétition entre les deux composés pour les sites de liaison de la CHA.

Le ratio OTA/TCA est maintenu constant, les concentrations ont cependant varié (1-5mM). Les résultats obtenus indiquent qu'à une concentration de 5 mM, le pourcentage du TCA lié diminue de 66% par rapport à la même concentration en absence d'OTA. La quantité de TCA adsorbée passe de 3.24 ± 0.16 mmole/ g à 1.09 ± 0.5 mmole/ g résine (Tableau 2, Article II). Cette diminution pourrait être expliquée par la nature de la liaison impliquée (Kos *et al*, 1991). Ces résultats sont en accord avec les données de notre étude *in vivo*, dans laquelle nous avons montré que la quantité d'AB sécrétée dans la bile est plus élevée dans le groupe consommant (CHA + OTA), que dans le groupe (CHA). Nous croyons qu'une interaction entre la toxine et la résine a affecté le pool des AB (Kerkadi *et al*, 1998).

Il ressort de cette étude que la CHA a une grande affinité et fait preuve d'une capacité à lier l'OTA. La CHA lie l'OTA par une liaison électrostatique et hydrophobique. La CHA a une préférence à lier l'OTA plus que le TCA.

4.3 Rôle des AB dans l'absorption de l'OTA

Le but de ces travaux est de déterminer l'importance des AB dans l'absorption de l'OTA chez le rat, ce qui appuie l'hypothèse de l'action indirecte de la CHA via la diminution du pool des AB.

À cet effet, nous avons utilisé un modèle qui consiste en une interruption de la circulation entérohépatique et un épuisement du pool des AB par l'implantation d'une fistule biliaire suivie par l'administration de l'OTA par gavage.

4.3.1 Débit biliaire et sécrétion des AB dans la bile

Tel que prévu, le débit biliaire diminue d'une façon significative dans le groupe ayant subi une interruption de la circulation entérohépatique comparé au groupe contrôle. La concentration et la sécrétion des AB ont aussi été influencées par les différents traitements. Dans le groupe de fistule biliaire, la sécrétion des AB est diminuée d'une façon significative par rapport au contrôle (11 ± 4 vs 42 ± 2 nmole/min. g foie).

4.3.2 Effet de l'interruption de la circulation entérohépatique sur la concentration de l'OTA dans le plasma

Dans le groupe contrôle (sans chirurgie), on a observé une élévation de la concentration d'OTA plasmatique 1 heure après l'administration de la toxine, le maximum sera atteint 3 heures après, puis on remarque une diminution 8 heures après. Dans le groupe "sham" (groupe ayant subi la chirurgie sans interruption de la circulation entérohépatique dans le but de contrôler l'effet stressant de la chirurgie), la concentration de l'OTA dans le plasma ne diffère pas de celle du contrôle. Une

interruption de la circulation entérohépatique pendant 6 heures a entraîné une diminution significative de la concentration de l'OTA à 1 et 3 heures après le gavage. Après 8 heures, les concentration plasmatiques sont presque identiques dans les 3 groupes (Tableau 4, Article II). Il est à noter que la circulation entérohépatique a été interrompue pendant 6 heures puisque la période plus prolongée a provoqué une diminution significative de l'ingestion alimentaire, ce qui pourrait constituer un facteur confondant dans l'interprétation des résultats obtenus. En effet, dans une étude antérieure, nous avons placé une fistule biliaire à des rats pendant 18 heures et nous avons administré de l'OTA par gavage (5 mg/kg PC) (Annexe 1). Les résultats obtenus ont montré que la chirurgie avait entraîné une diminution de l'ingestion alimentaire ainsi qu'une diminution du poids des animaux comparé au groupe contrôle (Tableau 1 et 2, Annexe 1). La concentration de l'OTA plasmatique dans le groupe de fistule biliaire était plus élevée que dans le groupe contrôle (Tableau 3, Annexe 1). Afin de vérifier l'importance du jeûne dans l'augmentation de la concentration plasmatique en OTA, nous avons soumis les rats à un jeûne (3g de diète/jour), nous avons donné l'OTA par gavage. Les résultats obtenus indiquent aussi une élévation de la concentration de l'OTA dans le plasma, si l'on compare au groupe contrôle.

Dans une étude complémentaire, nous avons supplémenté la diète avec de l'acide cholique (200 μ mole/jour) et nous avons administré l'OTA par gavage (5 mg/kg PC) à des rats. Les résultats obtenus montrent que l'addition de l'acide cholique dans la diète augmente significativement le débit biliaire (2.5 X) par rapport au groupe contrôle (2.9 ± 0.3 vs 1.1 ± 0.2 μ l/min. g foie). La sécrétion exprimée en nmole/ min. g foie est six fois plus élevée dans le groupe supplémenté comparé au groupe contrôle (248 ± 19 vs 42 ± 2 nmole/min. g foie).

Le tableau 1, (Annexe 2) montre l'effet de la supplémentation de l'acide cholique sur l'absorption de l'OTA chez le rat. On remarque une augmentation de l'absorption de l'OTA en fonction du temps (5.2 ± 0.8 à 30 min et 9.1 ± 1.3 μ g/ml à 24 h). La concentration maximale a été observée à 24 h. On n'a pas noté une différence significative dans l'absorption de l'OTA entre le groupe contrôle et le

groupe supplémenté. D'une façon générale, une supplémentation de la diète par l'acide cholique n' a pas augmenté l'absorption de l'OTA comparé au groupe contrôle.

La conclusion à tirer de cette étude est que la diminution du pool des AB est associée avec une baisse du taux plasmatique suggérant qu'une sécrétion normale des AB est un facteur essentiel à l'absorption de l'OTA. Dans nos conditions expérimentales, la supplémentation avec l'acide cholique n'a pas entraîné d'augmentation dans l'absorption de l'OTA.

Conclusion

L'utilisation des séquestrants pour prévenir la toxicité des mycotoxines est un moyen prometteur pour lutter contre la contamination des aliments par les mycotoxines. Les résultats de notre étude viennent confirmer et consolider cette approche.

En regard des objectifs et des hypothèses de notre étude, les conclusions que nous en tirons sont les suivantes:

1- L'addition de la CHA à une diète contaminée par l'OTA (1 et 3 ppm) entraîne une diminution du taux d'OTA dans le plasma, dans la bile, dans l'urine et une augmentation de son excrétion fécale.

2- La dose minimale efficace est fonction du niveau de la contamination: 0.1% de CHA pour un taux de 1ppm et 2.5% pour 3 ppm d'OTA.

3- La diminution de la concentration de l'OTA dans le plasma s'est traduite par une meilleure protection contre la néphrotoxicité évaluée par les marqueurs enzymatiques urinaires (γ GT et NAG) ainsi que par l'examen histologique.

4- Deux mécanismes par lesquels la CHA agirait pour prévenir la toxicité de l'OTA sont proposés:

- En premier lieu, par une liaison directe de la toxine avec la résine dans l'intestin, et une augmentation de son excrétion fécale. Cette liaison est de type électrostatique renforcée par des liaisons hydrophobes.

- En second lieu, par un effet indirect sur le pool des acides biliaires.

VI. Pistes de recherche

Plusieurs pistes de recherche peuvent être proposées à l'issue de cette étude:

- Comme la contamination des aliments par les mycotoxines est multiples c-à-d due à plusieurs types de moisissures, il serait important de voir l'efficacité de la CHA à prévenir ce type de toxicité.
- Étudier à long terme les effets de la supplémentation des aliments par la CHA sur la biodisponibilité des nutriments (vitamines et minéraux) dans le but d'apporter des corrections.
- Évaluer les coûts occasionnés par cette intervention qui reste un facteur déterminant pour son utilisation prophylactique.
- Tester d'autres résines comme la cholestagel qui a une meilleure capacité à lier les AB si l'on compare à la CHA.

BIBLIOGRAPHIE

Abramson, D.F., Sinha, R.N. and Mills, J.T. (1985) Mycotoxin formation and quality changes in granary stored corn at 16 and 21% moisture content. **Sci. Aliment** 6-5: 653-663.

Abramson, D.F., Sinha, R.N. and Mills, J.T. (1990) Mycotoxin formation in Hy-320 wheat during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Mycopathologia** 111: 181- 189.

Ademoyero, A.A. and Dalvi, R.R. (1983) Efficacy of activated charcoal and other agents in the reduction of hepatotoxic effects of a single dose of aflatoxin B1 in chickens. **Toxicol. Lett** 16: 153-157.

Albassam, M.A., Yong, S.I., Bhatnagar, R., Sharma, A.K. and Prior, M.G. (1987) Histopathologic and electron microscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin A in rats. **Vet. Pathol** 24: 427-435.

Aleo, M. D., Wyatt, R.D. and Schnellman, R.G. (1991) Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 107: 73-80.

Arora, R.G. and Frolen, H. (1981) Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. II. Ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of gestation. **Acta Vet. Scand** 22: 535-538.

Bailey, C.A., Gibson, R.M., Kubena, L.F., Huff, W.E. and Harvey, R.B. (1990) Impact of phenylalanine supplementation on the performance of three-week-old broilers fed diets containing ochratoxin A. 2. Effects on hematology and clinical chemistry. **Poultry. Sci.** 69: 420-425.

Ballinger, M.B., Phillips, T.D. and Kubeda, L.F. (1986) Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the pregnant rat. **J. Food . Safety** 8: 11-24.

Barnes, J.M., Carter, R.L., Peristianis, G.C., Austwick, P.K.C., Flynn, F.V. and Aldridge, W.N. (1977) Balkan (endemic) nephropathy and a toxin-producing strain of penicillium verrucosum var cyclopium: an experimental model in rats. **Lancet** 1: 671-675.

Baudrimont, I., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Pfohl-Leszkowics, A., Dirheimer, G. and Creppy, E.E. (1994) Effect of superoxyde dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. **Toxicology** 89: 101-111.

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: 147-154.

Bauer, J., Gareis, M. and Gedek, B. (1986) Incidence of ochratoxin A in blood serum and kidneys of man and animals. In Proceedings of the 2nd World Congress Foodborne infections and intoxications, Berlin, Allemagne.

Bauer, J. and Gareis, M. (1987) [Ochratoxin A in the food chain] **J. Vet. Med** B34: 613-627 (in German).

Baxter, C.S., Wilson, D.W. and Burg, W.R. (1981) A prospective analysis of the potential risk associated with inhalation of aflatoxin-contaminated grain dusts. **Food. Cosmet. Toxicol** 19: 765-769.

Bendele, A.M., Carlton, W.W., Krogh, P. and Lillehoj, E.B. (1985a) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J x C3H) F1 mouse. **J. Natl. Cancer Inst** 75: 733-742.

Bendele, A.M., Neal, S.B., Oberly, T.G., Thompson, E.Z., Bewsey, B.J., Hill, L.E., Rexroat, M.A., Carlton, W.W. and Probst, G.S. (1985b) Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. **Food Chem. Toxicol** 23: 911-918.

Benson, G. M., Haynes, C., Blanchar, S. and Ellis, D. (1993) In vitro studies to investigate the reasons for the low potency of cholestyramine and colestipol. **J. Pharm. Sci** 82, 80-86.

Berant, M., Wagner, Y. and Cohen, N. (1976) Cholestyramine in the management of infantile diarrhoea. **J. Pediat** 88: 153- 154.

Berndt, W.O. and Hayes, A.W. (1979) In vivo and in vitro changes of renal functions caused by ochratoxin A in the rat. **Toxicology** 12, 5-17.

Berndt, W.O., ayes, A.W. and Phillips, R.D. (1980) Effects of mycotoxins on renal function: Mycotoxic nephropathy. **Kidney Int** 18: 656-664.

Berndt, W.O. (1993) Effects of selected fungal toxins on renal function . In J.B Hook, Goldstein, R.s. (Eds) Toxicology of the kidney. New York, Raven, pp 459-475.

Boley, A. and Muller, H.M. (1986) Production of ochratoxin A, citrinin, and ergosterol by *Penicillium viridicatum* in autoclaved and non autoclaved wheat at low temperature. **Mycotoxin Research** 2, 99-103.

Boorman, G. (1989) NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N Rats (gavage studies). In: G. Boorman (Ed), National Institute of Health Publication No. 89-2813, US Department of Health and Human Resources, Research Triangle Park.

Bose, S. and Sinha, S.P. (1994) Modulation of ochratoxin-produced genotoxicity in mice by vitamin C. **Food Chem. Toxicol** 32: 533-537.

Bozi'c, Z., Duancic, V., Belicza, M., Kraus, O. and Skljarov, I. (1995) Balkan endemic nephropathy : Still a mysterious disease. **Eur. J. Epidem** 11: 235-238.

Breitholz, A., Olsen, M., Dahlback, A. and Hult, K. (1991) Plasma ochratoxin A levels in tree swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. **Food addit. Contam** 8: 183-193.

Braun, J.P., Rico, A.G., Benard, P., Burgat-sacaze, V., Eghbali, B. et Godfrain, J.C. (1978) La gamma-glutamyl transferase urinaire en toxicologie rénale chez le rat. Bases de son utilisation-intérêt lors de la néphrite aigue mercurielle. **Toxicology** 11: 73-82.

Brown, M.H., Szczeck, G.M. and Purmalis, B.P. (1976) Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 37: 331-338.

Bunge, I., Dirheimer, G. and Roschenthaler, R. (1978) *In vitro* and *in vivo* inhibition of protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* by ochratoxin A. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 83: 398-405.

Burkhardt, J.E., Biehl, M.L., Kowsz, K.P., Kadyszewski, E., Fisher, D.O. and Ochoa, R. (1998) Effects of cholestyramine and diet on small intestinal histomorphometry in rats. **Toxicol. Pathol** 26: 271-275.

Burt, H.M., Cameron, E. C., Erber, H. And Price, J.D. (1987) Ion-Exchange resins as potential phosphate -binding agents for renal failure patients : Effect of the physiochemical properties of resins on phosphate and bile salt binding. **J. Pharm. Sci** 76, 379-383.

CAST (1989) Mycotoxins: economic and health risks. Council for Agricultural Sciences and Technology 116, Iowa, 85 p.

Castegnaro, M., Friesen, M., Michelon, J. and walker, E.A. (1981) Problems related to the use of sodium hypochlorite in the detoxification of aflatoxin B1. **Am. Indus. Hyg. Assoc. J** 42: 398-401.

Castegnaro, M., Bartsch, H. and Chernozemsky, I.N. (1987) Endemic nephropathy and urinary tract tumours in the Balkans. **Cancer Res** 47: 3608-3609.

Castegnaro, M. and Chernozemsky, I.N. (1987) Endemic nephropathy and urinary tract tumours in the Balkans. **Cancer Res** 47: 3608-3609.

Castegnaro, M., Bartsch, H., Bereziat, J.C., Arvela, P., Michelon, J. and Broussolle, I. (1989) Polymorphic ochratoxin A hydroxylation in rats strains phenotyped as poor and extensive metabolizers of debrisoquine. **Xenobiotica** 19: 225-230.

Castegnaro, M. (1995) Les mycotoxines: des contaminants omniprésents dans l'alimentation humaine et animale, risque et prévention. In M. Moll. and N. Moll (Eds) Sécurité alimentaire des consommateurs. TEC/DOC Lavoisier, Paris, pp 56-78.

Ceovic, S., Hrabar, A. and Saric, M. (1992) Epidemiology of balkan endemic nephropathy. **Food. Chem. Toxicol** 30: 2183-2188.

Chakor, K., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1988) *In vivo* studies on the relationship between hepatic metabolism and toxicity of ochratoxin A. **Arch. Toxicol suppl** 12: 201-204.

Chang, F.C. and Chu, F.S. (1977) The fate of ochratoxin A in rats. **Food Cosmet. Toxicol** 15: 199-204.

Chang, C.F., Huff, W.E. and hamilton, P.B. (1979) A leucocytopenia-induced in chicken by dietary ochratoxin A. **Poultry. Sci** 58: 555-558.

Charmley, L.L., Trenholm, H.L., Prelusky, D.B. and Rosenberg, A. (1995) Economic losses and decontamination. **Natural Toxins** 3: 199-203.

Chelack, W.S., Borsa, J., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1991) Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var *alutaceus* NRRL 3174. **Appl. Environm Microbiol** 57: 2492-2496.

Chelkowski, J., Golinski, P., Godlewska, B., Radomska, W., Szebiotko, K. and Wiewiorowska, M. (1981) Mycotoxins in cereal grains. Part IV. Inactivation of ochratoxin A and other mycotoxins during ammoniation. **Nahrung** 25: 631-637.

Chelkowski, J., Szebiotko, K., Golinski, P., Buchowski, M., Godlewska, B., Radomska, W., and Wiewiorowska, M. (1982) Mycotoxins in cereal grains. Part V. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. **Nahrung** 26: 1-7.

Chelkowski, J. (1991) Preface and introduction. In J. Chelkowski (Ed) Cereal grain, Mycotoxic fungi and quality in drying and storage, Develo. Food Sci. 26, Elsevier. Sci. Publ., Amsterdam, I-XXii.

Chernozemsky. I.N., Stoyanov, I.S., Petkova-Bocharova, T.K., Nocolov, I.G., Draganov, I.V., Stoichev, 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. **J. Cancer** 19: 1-11.

Chu, F.S. (1971) Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. **Arch. Biochem. Biophys** 147: 359-366.

Chu, F.S. (1974) Studies on ochratoxin. **CRC Crit. Rev. Toxicol** 2: 499-524.

Clas, S.D. (1991) Quaternized Colestipol, an improved bile salt adsorbent: In vitro studies. **J. Pharm. Sci** 80, 128-131.

Creppy, E.E., Lugnier, A.A.J., Fasiolo, F., Heller, K., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1979) In vitro inhibition of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. **Chem. Biol. Interact** 24: 257-262.

Creppy, E.E., Lorkowski, G., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1982) Kinetics of immunosuppressive action of ochratoxin A on mice. In : Proceedings V International IUPAC Symposium Mycotoxins and Phycotoxins, Vienna, pp 289-292.

Creppy, E.E., Stormer, F.C., Roschenthaler, R. and Dieheimer, G. (1983) Effects of two metabolites of ochratoxin A, [4R]-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin, on the immune response in mice. **Infect. Immunol** 39: 1015-1018.

Creppy, E.E., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1984) Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine . **Food. Chem. Toxicol** 22: 883-886.

Creppy, E.E., Kane, A., Dirheimer, G., Lafarge-Frayssinet, C., Mousset, S. and Frayssinet, C. (1985) Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney. **Toxicol. Lett** 28, 29-35.

Creppy, E.E., Kane, A. Giessen-crouse, E., Roth, A., K., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1986) Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells . **Arch. Toxicol. Suppl 9**: 310-314.

Creppy, E.E., Chakor, K., Fisher, M.J. and Dirheimer, G. (1990) The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and *in vivo*. **Arch. Toxicol** 64: 279-284.

Creppy, E.E., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Counord, J., Castegnaro, M., Bartsch, H., Moncharmont, P., Fouillet, B., Chambon, P. and Dirheimer, G. (1991) Human ochratoxicosis in France. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (Eds) Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours, IARC Scientific Publications No.115, Lyon, pp 145-151.

Creppy, E.E., Castegnaro, M., Grosse, Y., Meriaux, J., Manier, C., Moncharmont, P. and Waller, C. (1993) Étude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et région Rhône-Alpes. In E.E. Creppy, M. Castegnaro, G. Dirheimer (Eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd, volume 231, pp 147-158.

Creppy, E.E., Baudrimont, I. and Betbeder, A.-M. (1995a) Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A , a food contaminant. **Toxicol. Lett** 82/83, 869-877.

Creppy, E.E., Baudrimont, I. and Betbeder, A.M. (1995b) Ochratoxins and toxicological consequences. **Cryptogamie. Mycology** 16, 195-221.

Creppy, E.E., Baudrimont, I., Belmadani, A. and Betbeder, A.-M (1996) Aspartame as a preventive agent of chronic toxic effects of ochratoxin A in experimental animals. **J. Toxicol. Tox. Rev** 15, 207-221.

Cvetnic, Z. and Pepeljnjak, S. (1990) Ochratoxinogenicity of *Aspergillus ochraceus* strains from nephropathic and non-nephropathic areas in Yugoslavia. **Mycopathologia** 110, 93-99.

Danilovic, V., Pjurisic, M., Mokranjac, M., Stojimirovic, B., Zivojinovic, J. and Stojakovic, P. (1957) Néphrites chroniques provoquées par l'intoxication au plomb par voie digestive (farine). **Presse. Med** 65: 2039-2040.

Davidson, J.N., Babish, J.G., Delaney, K.A., Taylor, D.R., Phillips, T.D. (1987) Hydrate sodium calcium aluminosilicate decreases the bioavailability of aflatoxin in the chicken. **Poultry. Sci** 66 (suppl 1): 89.

De Scott, B. (1965) Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. **Mycopathol. Mycol. Appl** 25: 213-222.

De Groene, Els M., Jahn, A., Horbach, G.J. and Fink-Gremmels, J. (1996) Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. **Environ Toxicol. Pharma** 21, 21-26.

Deberghes, P., Deffieux, G., Gharbi, A., Betbeder, A.M., Boisard, F., Blanc, R., Delaby, J.F. et Creppy, E.E. (1993). Détoxification de l'ochratoxine A par des moyens physiques, chimiques et enzymatiques. In E.E. Creppy, M. Categnaro, G. Dirheimer (Eds) Human ochartoxicosis and its pathologies, Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd, volume 231, pp 75-82.

Decker, W.J. and Corby, D.G. (1980) Activated charcoal absorbs aflatoxin B1. **Vet. Hum. Toxicol** 22: 388-389.

Dekant, W. and Vamvakas, S. (1989) Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation, formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate β -lyase. **Drug. Metab. Reviews** 20: 43-83.

Delacruz, R. and Bach, P.H. (1990) The role of ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. **J. Biopharmacol. Sci** 1: 277-304.

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.

Dotchev, V.D. (1973) [La néphropathie endémique (Balkanique) en Bulgarie] **Müench. Med. Woenschr** 15: 537-541. (German)

Dwyer, M.R., Kubena, L.F., Harvey, R.B, Mayura, K., Sarr, A.B., Buckley, S.A., Bailey, R.H. and Phillips, T.D. (1997). Effects of inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens. **Poul. Sci** 76: 1141-1149.

El Banna, A. and Scott, P.M. (1984) Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs III. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba*) and polished wheat. **J. Food. Protec** 47: 189-192.

Elling, F., Hald, B., Jacobsen, C. and Krogh, P. (1975) Spontaneous cases of toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. **Acta Path. Micr. Sci** Section A 83: 739-741.

Elling, F., Nielson, 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.

Fink-Gremmels, J., Blom, M. and Woutersen van Nijnanten, F. (1993) In vitro investigations on ochratoxin A metabolism. In E.E. Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, volume 231, pp 67-74.

Fink-Gremmels, J., Jahn, A. and Blom, M.J. (1995) Toxicity and metabolism of ochratoxin A. **Natural Toxins** 2: 214-220.

Fouler, S.G., Trivedi, A. and Kitabatake, N. (1994) Detoxication of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. **J. AOAC International** 77, 631-637.

Follman, W., Hillebrand, I.E., Creppy, E.E. and Bolt, H.M. (1995) Sister chromatid exchange frequency in culture isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and O_tα. **Arch. Toxicol** 69: 280-286.

Friis, C., Brinn, R. and Hald, B. (1988) Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. **Toxicology** 52: 209-217.

Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (1989) Terverticillate *Penicillia*: Chemotaxonomy and mycotoxin production. **Mycologia** 81: 837-861.

Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (1991) Mycotoxins produced in species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. In J. Chelkowski (Ed) Cereal grain mycotoxins, fungi and quality in drying and storage, Elsevier, Amsterdam, pp 441-476.

Frohlich, A.A., Marquardt, R.R. and Ominski, K.H. (1991) Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: A canadian perspective. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (Eds), Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours, IARC Scientific Publications volume 115, Lyon, pp 139-143.

Frye, C.E. and Chu, F.S. (1977) Distribution of ochratoxin A in chicken tissues and eggs. **J. Food Safety** 1: 147-159.

Fuchs, R., Radic, B., Peraica, M., Hult, K. and Plestina, R. (1988) Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats. **Period. Biologorum** 90: 39-42.

Galey, F.D., Lambert, R.J., Busse, M. and Buck, W.B. (1987) Therapeutic efficacy of superactive charcoal in rats exposed to oral lethal doses of T-2 toxin. **Toxicon** 25: 493-499.

Gallo, D.G., K.R. Bailey, and A.L. Sheffner. 1965. The interaction between cholestyramine and drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med** 120: 60-65.

Galtier, P. (1974a) Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal. I. Transport sanguin de la toxine chez le rat. **Ann. Rech. Vét** 5: 311-318.

Galtier, P. (1974b) Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal. II. Distribution tissulaire et élimination chez le rat. **Ann. Rech. Vét** 5: 319-328.

Galtier, P., More, J. and Bodin, G. (1974c) Toxines d'*Aspergillus ochraceus* Wilhelm III. Toxicité aiguë de l'ochratoxine A chez le rat et la souris adultes. **Ann. Rech. Vét** 5: 233-247.

Galtier, P., Baradat, C. and Alvinerie, M. (1977) De l'élimination d'ochratoxine A par le lait chez la lapine. **Ann. Nutr. Aliment** 31: 911-918.

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 Metab. Disposition** 7:429-434.

Galtier, P., Alvinerie, M. and Charpentreau, J.L. (1981) The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food Cosm. Toxicol** 17: 49-53.

Galtier, P., Alvinerie, M. and Le Bars, J. (1984) Comparative incidence of oral ochratoxicosis on the activity of drug-metabolizing enzymes in rat liver. **Toxicol. Lett** 245: 7558-7560.

Galtier, P. (1991) Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (Eds) Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours. IARC Scientific Publications No. 115, Lyon, pp 187-200.

Galtier, P., Larrieu, G. And Alvinerie, M. (1993) Influence de l'ochratoxine A sur le devenir des xénobiotiques. In E.E . Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, volume 231, pp 59-65.

Galvano, F., Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, A., Chies, L. and Galvano, M. (1998) Activated carbons: In vitro affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **J. Food. Protec** 61: 469-475.

Gareis, M., Martlbauer, E., Bauer, J. and Gedek, B. (1988) [Determination of ochratoxin A in breast milk] **Z. Lebensm. Unters. Forsch** 186: 114-117 (in German).

Gekle, M., Oberleithner, H. and Silbernagl, S. (1993) Ochratoxin A impairs post-proximal nephron function in vivo and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-darby canine kidney cells in vitro. **Eur. J. Physiol. Pflugers Arch.** 425: 401-408.

Gibson, R.M., Bailey, C.A., Kubena, L.F. (1990) Impact of l-phenylalanine supplementation on the performance of three-weeks- old broilers fed diets containing ochratoxin A: 1. Effects on body weight, feed conversion, relative organ weight, and mortality. **Poult. Sci** 69: 414-419.

Gilani, S.H., Bancroft, J. and Reily, M. -(1978) Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 46: 543-546.

Godin, M., Fillastre, J.P., Simon, P., Francois, A., Le Roy, F. And Morin, J.P. (1997) Is ochratoxin A nephrotoxic in human beings? **Advan. Nephrol** 26: 181-206.

Gordon, A. and M. Roberts. 1980. Ion-exchangers and their clinical applications. In C. Giordano (Ed) Sorbents and their clinical applications, Academic Press, Inc., pp 249-273.

Grant, P.G. and Phillips T.D. (1998) Isothermal adsorption of aflatoxin B₁ on HSCAS clay. **J. Agric. Food Chem** : 599-605.

Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H. and Pfohl-Leszkowicz, A. (1997) Retinol, ascorbic acid and α -tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. **Cancer. Lett** 114: 225-229

Hadidane, R., Bacha, H., Creppy, E.E., Hammmami, M., Ellouz, F. and Dirheimer, G. (1992) Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*. **Toxicology** 76: 233-243.

Hagelberg, S., Hult, K. And Fuchs, R. (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma binding properties. **J. Appl. Toxicol** 9: 91-96.

Hagerman, L.M., Julow, D.A. and Schneider, D.L. (1973) In vitro binding of mixed micellar solutions of fatty acids and bile salts by cholestyramine. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med** 143, 89-92.

Hald, B. (1989) Human exposure to ochratoxin A. In S. Natori, Hashimoto, K. and Ueno, Y. (Eds) *Mycotoxins and Phycotoxins '88*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp 57-67.

Hasinoff, B.B., Rahimtula, A.D. and Omar, R.F. (1990) NADPH-cytochrome P450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron (III)-ochratoxin A complex. **BBA** 1036: 78-81.

Hatch, R.C., Clark, J.D., Jain, A.V. and Weiss, R. (1982) Induced acute aflatoxicosis in goats: treatment with activated charcoal or dual combinations of oxytetracycline, stanozolol, and activated charcoal. **Am. J. Vet. Res** 43: 644-648.

Haubeck, H.D., Lorkowski, G., Kolsch, E. and Roschenthaler, R. (1981) Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. **Appl. Environ. Microbiol** 41: 1040-1042.

Hayden, J.W. and Comstock, E.G. (1975) Use of activated charcoal in acute poisoning. **Clin. Toxicol** 8: 515-533.

Hayes, A.W., Hood, R.D. and Lee, H.L. (1974) Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. **Teratology** 9: 93-98.

Heller, K. and Roschenthaler, R. (1978) Inhibition of protein synthesis in *Streptococcus faecalis* by ochratoxin A. **Can. J. Microbiol** 24: 466-472.

Hennig, A., Finks-Gremmels, J. and Leistner, L. (1991) Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In: M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (Eds) *Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours.*, IARC Scientific Publications No. 115, Lyon, pp 255-260.

Herrman, J.L. (1991) Risk evaluation of ochratoxin A by the joint FAO/WHO expert committee on food additives .In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch. (Eds) *Mycotoxin, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours*, I.A.R.C Scientific Publications, No 115, Lyon, pp 327-329.

Hietanen, E., Malaveille, C., Camus, A.M., Bereziatec, 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. **Drugs. Metabol. Dispos** 14: 118-126.

Holmberg, T., Breitholtz, A., Bengtsson, A. and Hult, K. (1990) Ochratoxin A in swine blood in relation to moisture content in feeding barley at harvest. **Acta. Agric. Scand** 40, 201-204.

Holmberg, T. (1992) Ochratoxin A in cereal grain and its potential effects on animal health. PhD Thesis, Uppsala, Sweden, 47 p.

Hrabar, A., Suljaga, K., Borcic, B., Aleraj, B., Ceovic, S. and Cvoriscec, D. (1976) Endemic nephropathy morbidity and mortality in the village of Kaniza. **Arch. Ind. Hyg. Toxicol** 27: 137-145 (in Croatian).

Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B. and Phillips, T.D. (1992) Efficacy of hydrate sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. **Poultry. Sci** 71:64-69.

Hult, K., Teiling, A. and Gatenbeck, S. (1976) Degradation of ochratoxin A by a ruminant. **Appl. Environ. Microbiol** 32: 443-444.

Hult, K., Hokby, E., Hagglund, U., Gatenbeck, S., Rutqvist, L. and Sellyey, G. (1979) Ochratoxin A in pig blood: Method of analysis and use as a tool for feed studies. **Appl. Environ. Microbiol** 38: 772-776.

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. **Appl. Env. Microb** 39: 828-830.

Hult, T.K., Rutqvist, L., Holmberg, T., Thafvelin, B. and Gatenbeck, S. (1984) Ochratoxin A in blood of slaughter pigs. **Nord . Vet. Med** 36: 314-316.

IARC (1993) IARC monographies on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans, Some naturally occurring substances: some food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, volume 56, Lyon, pp 489-521.

IPCS (1990) Selected mycotoxins: ochratoxins, trichotecenes, ergot. Environmental Health Criteria 105, pp 29-70.

Jakoby, W.B. and Habig, W.H. (1980) Glutathione transferases. In W. B. Jakoby (Ed) Enzymatic basis of of detoxication , Orlando, Floride, Academic Press, pp 63-94.

Jelinek, C.F, Pohland, A.E. and Wood, G.E. (1989) Worldwide occurence of mycotoxins in foods and feeds: An update. **J. Assoc. Off. Anal. Chem** 72: 223-230.

Jevremovic, I., Jankovic, S., Radovanovic, Z., Danilovic, V., Dragisa Velimirovic, D., Naumovic, T., valla, C., Stamenkovic, M., Burvic, D., Stojanovic, V., Trbojevic, S. and Hall, P.W. (1991) β_2 -microglobulinuria in a population exposed to Balkan endemic nephropathy: inferences from repeated cross-sectional studies. **Kidney Int** 40 (suppl): S35-S37.

Johns, W.H. and T.R. Bates. 1969. Quantification of the binding tendencies of cholestyramine I: effect of structure and added electrolytes on the binding of unconjugated and conjugated bile salt anions. **J. Pharm. Sci** 58: 179-183.

Jonsyn, F.E., Maxwell, S.M. and Henderickse, R.G. (1995) Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. **Mycopathologia** 131: 121-126.

Jørgensen, K., Rasmussen, G. and Thorup, I. (1996) Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. **Food Additives and Contaminants** 13: 95-104.

Jung, K.Y. and Endou, H. (1989) Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 100: 383-390.

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.

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. **Arch. Toxicol** 58: 219-224.

Kanisawa, M. and Suzuki, S., Kozuka, Y. and Yamazaki, M. (1977) Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin A in rats. I. Acute oral toxicity. **Toxicol. Appl. Pharm** 42: 55-64.

Kanisawa, M. and Suzuki, S. (1978) Induction of renal and hepatic tumours in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. **Gann** 69: 599-600.

Kanisawa, M. (1984) Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. **Dev. Food. Sci** 7: 245-254.

Kassner, J.T., Maher, I.J., Hull, K.M. and Woolf, A.D. (1993) Cholestyramine as an adsorbent in acute lindane poisoning: a murine model. **Ann. Emerg. Med** 22: 1392-1397.

Kerkadi, A., C. Barriault, A.A. Frohlich, R.R. Marquardt, G. Bouchard, I.M. Yousef, and B. Tuchweber. 1998. Dietary cholestyramine reduces ochratoxin A-induced nephrotoxicity in the rat by decreasing plasma levels and enhancing fecal excretion of the toxin. **J. Toxicol. Environ. Health** 53: 231-250.

Khalef, A., Zidane, C., Charef., Gharbi, A., Tadjerouna, M., Betbeder, A.M and Creppy, E.E (1993) Ochratoxicose humaine en Algérie. In E.E Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, colloque INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd, volume 231, pp1123-127.

Kimura, T., Inui, K.I. and Sezaki, H. (1985) Differences in effects on drug absorption between dihydroxy and trihydroxy bile salts. **J. Pharmacobio-Dyn** 8, 578- 585.

Kontaxi, M., Eckhardt, u., hagenbuch, B., Stieger, B., Meier, P.J. and Petzinger, E. (1996) Uptake of the mycotoxin ochratoxin A in liver cells occurs via the cloned organic anion transporting polypeptide. **J. Pharma. Exper. Therapeu** 279: 1507-1513.

Kos, R., White, J.L., Stanley, L.H. and Borin, M.T. (1991) Effect of competing anions on binding of bile salts by cholestyramine. **Pharm. Res** 8: 238-241.

Krogh, P., Axelsen, N.H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., larsen, A.E., Madsen, A., Mortensen, H.P., Moller, T., Petersen, O.K., Ravnskov, U., Rostgaard, M. and Aalund, O. (1974) Experimental porcine nephropathy: Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand** 246: 1-21.

Krogh, P. (1976a) Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. **Nord. Vet. Med** 28: 452-458.

Krogh, P., Elling, F., Hald, B., Larsen, A.E., Lillehoj, E.B., Madsen, A. And Mortensen, H.P. (1976b) Time dependent disappearance of ochratoxin A residues in tissues of bacon pigs. **Toxicology** 6: 235-242.

Krogh, P. (1977) Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. **Nord. Vet. Med** 29: 402-405.

Krogh, P. (1978) Causal association of mycotoxic nephropathy. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.** A269: 1-28.

Krogh, P. (1987) Ochratoxin A in food. In P. Krogh (Ed) *Mycotoxins in food*, Academic Press, New York, pp 97-121.

Krogh, P. (1992) Role of ochratoxin A in disease causation. **Food Chem. Toxic** 30: 213-224.

Kubena, L.F., Harvey, R.B, Bailey, R.H., Buckley, S. and Rottinghaus, C.E. (1998) Effects of hydrate sodium aluminosilicate (T-BIND (TM)) on mycotoxicosis in young broiler chickens. **Poultry. Sci** 77: 1502-1509.

Kuczuk, M.H., Benson, P.M., Health, H. And Hayes, W. (1978) Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Mut. Res** 53: 11-20.

Kuiper-Goodman, T. and Scott, P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biom. Environ Sci** 2: 179-248.

Kuiper-Goodman, T. (1991a) Risk assessment of ochratoxin A residues in food. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch. (Eds) Mycotoxin, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours. Volume 215, I.A.R.C, Lyon, pp 307-320.

Kuiper-Goodman, T. (1991b) Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. **Vet. Hum. Toxicol** 33: 325-333.

Kuiper-Goodman, T., Ominski, K., Marquardt, R.R, Malcolm, S., Mc Mullen, E., Lambbaert, G.A. and Morton, T. (1993) Estimating human exposure to ochratoxin A in Canada. In E.E Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, colloque INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd, 231, pp 167-174.

Kuiper-Goodman, T. (1994) Prevention of human mycotoxicoses through risk assessment and risk management. In J.D. Miller and A.L. Trenholm (Eds) Mycotoxins in grain, Eagan Press, St-Paul, Mn, pp 439-470.

Kumagai, S. and Aibara, K. (1982) Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 64: 94-102.

Kumagai, S. (1985) Ochratoxin A : Plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. **Food Chem. Toxicol** 23: 941-943.

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

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

Lafleur, M.V.M. and Retel, J. (1993) Contrasting effects of SH-compounds on oxidative DNA damage, repair and increase of damage. **Mut. Res** 295: 1-10.

Lai, M., Semeniuk, G. and Hesseltine, C.W. (1970) Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. **Appl. Microbiol** 19: 542-544.

Lea, T., Steien, K. and Stormer, F.C. (1989) Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. **Mycopathologia** 107: 153-159.

Lee, S.C., Beery, J.T. and Chu, F.S. (1984) Immunohistochemical fate of ochratoxin A in mice. **Toxicol. Appl. Microbiol** 72: 218-227.

Leeson, S., Diaz, G. and Summers, J.D. (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books Publisher, Guelph, Ontario, pp 227-248.

Lemke, S.L., Grant, P.G. and Phillips T.D. (1998) Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. **J. Agric. Food. Chem** 46: 3789-3796.

Lillehoj, E.B. and Elling, F. (1983) Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. **Acta. Agric. Scand** 33: 113-128.

Lindenbaum, S. And Higuchi, T. (1975) Binding of bile acids to cholestyramine at gastric pH conditions. **J. Pharm. Sci** 64, 1887-1889.

Luner, P.E. and Amidon, G.L. (1992) Equilibrium and kinetic factors influencing bile sequestrant efficacy. **Pharm. Res** 9: 670-676.

Maaroufi, K., Achour, A., Hammami, M., El May, M., Betbeder, A.M., Ellouz, F., Creppy, E.E. and Bacha, H. (1995a) Ochratoxin A in blood in relation to nephropathy in Tunisia. **Hum. Exp. Toxicol** 14: 609-615.

Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A.M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E.E. and Bacha, H. (1995b) Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. **Arch. Toxicol** 69: 552-558.

Madhyastha, M.S., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. and Abramson, D. (1990) Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. **J. Agric. Food. Chem** 38: 1506-1510.

Madhyastha, M.S., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992a) Hydrolysis of ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats. **Arch. Environ. Contam. Toxicol** 23: 468-472.

Madhyastha, M.S., Frohlich, A.A. and Marquardt, R.R. (1992b) Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. **Food Chem. Toxicol** 30: 709-714.

Madsen, A., Elling, F., Hald, B., Mortensen. H.P and Winthther, P. (1980) The effect on pigs of ochratoxin A-contaminated barley treated with ammonia. In N.C. Nielsen, P. Hogh and N. Bille (Eds) Proceedings IPVS congress, Copenhagen, Denmark, pp 287.

Madsen, A., Mortensen. H.P and Hald, B.(1982) Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. I. Influence on pig performance and residues. **Acta Agric. Scan** 32: 225-239.

Madsen, A., Elling, F., Hald, B. and Mortensen. H.P (1983) Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 3. Detoxification by ammoniation heating + NaOH, or auto-claving. **Acta Agric. Scand** 33: 171-175.

Manolova, Y., Manolov, G., Parvanova, L., Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M. and Chernozemsky, I.N. (1990) Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly x-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan Endemic Nephropathy. **Mut. Res** 231: 143-149.

Mantle, P.G. and Mc Hugh, K. (1993) Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. **Mycol. Res** 97: 205-212.

Marquardt, R.R., Frohlich, A.A. and Abramson, D. (1990) Ochratoxin A: an important western Canadian storage mycotoxin. **Can. J. Physiol. Pharmacol** 68: 991-999.

Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **J. Anim. Sci** 70: 3968-3988.

Mayura, K., Reddy, R.V., Hayes, A.W. and Berndt, W.O. (1982) Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. **Toxicology** 25: 175-185.

Mayura, K., Parker, R., Berndt, W.O. and Phillips, T.D. (1984) Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: partial protection by phenylalanine. **Appl. Environ. Microbiol** 48: 1186-1188.

Mayura, K., Edwards, J. F., Maull, E.A. and Phillips, T.D. (1986) The effects of ochratoxin A on postimplantation rat embryo limb buds. **Toxicol. Lett** 54: 129-134.

Meisner, H. and Chu, S. (1979) Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. **Biophys.** 73: 132-140.

Meisner, H. and Selanik, P. (1979) Inhibition of renal gluconeogenesis in rats by ochratoxin A. **Biochem. J** 180: 681-684.

Meisner, H. and Meisner, P. (1981) Ochratoxin A, an in vivo inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase. **Arch. Biochem. Biophys** 208: 146-153.

Meisner, H. and Krogh, P. (1982) Inhibition of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase in pigs by alimentary exposure to ochratoxin A. In *Mycotoxins and Phycotoxins*, proceedings of the 5th International IUPAC Symposium, Vienna, Technical University Vienna Publ, pp 342-345.

Meisner, H., Cimbala, M.A and Hanson, R.W. (1983) Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly (A) RNA level by ochratoxin A. **Arch. Biochem. Biophys** 223: 264-270.

Micco, C., Ambruzzi, M.A., Miraglia, M., Brera, C., Onori, R. and Benelli, L. (1991) Contamination of human milk with ochratoxin A. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch (Eds), *Mycotoxin, endemic nephropathy and urinary tract tumours*, IARC Scientific Publications volume 115, Lyon, pp105-108.

Milanez, T.V. and Leitao, M.F.F. (1996) The effect of cooking on ochratoxin A content of beans, variety Carioca. **Food Additives and Contaminants** 13: 89-93.

Miller, J.D. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. **J. Stored Prod. Res** 31: 1-16.

Miyazaki, S., Inoue, H., Yamahira, T. and Nadai, T. (1979) Interaction of drugs with bile components . I. Effects of bile salts on the dissolution behavior of indomethacin and phenylbutazone . **Chem. Pharm. Bull** 27: 2468- 2472.

Mori, H., kawai, K., Bayashi, F., Kuniyasu, T., Yamazaki, M. 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.

Moroi, K., Suzuki, S., Kuga, T., Yamazaki, M. and Kanizawa, M. (1985) Reduction of ochratoxin A toxicity in mice treated with phenylalanine and phenobarbital. **Toxicol. Lett** 25: 1-5.

Mortenson, H.P, Hald, B. and Madsen, A. (1983) Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. **Acta. Agricul Scand** 33: 235-239.

Mullan, N.A., M.N. Burgess, R.J. Bywater, and P.M. Newsome. (1979). The ability of cholestyramine resin and other adsorbents to bind *Escherichia Coli* enterotoxins. **J. Med. Microbiol** 12: 487-496.

Ngaha, E.O. (1985) Biochemical changes in the rat during experimentally induced acute ochratoxicosis. **Enzyme** 33: 1-8.

Nip, W.K. and Chu, F.S. (1979) fate of ochratoxin A in goats. **J. Environ. Sci. Health B** 14: 319-333.

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. Prot** 42: 485-490.

Omar, R.F., Rahimtula, A.D. and Bartsch, H. (1991) Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. **J. Biochem. Toxicol** 6: 203-209.

Omar, R.F., Gelboin, H.V. and Rahimtula, A.D. (1996) Effect of Cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. **Biochem Pharmacol** 51, 207-216.

OMS (1980) Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11, Geneve, 127p.

OMS (1991) Evaluation de certains additifs alimentaires et contaminants. Trente-septième rapport du comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires.. Rapport technique n°806, Geneve, pp 28-31.

Osborne, B.G., Ibe, F., Brown, G.L., Petagine, F., Scudamore, K., Banks, J.N., Hetmanski, M.T. and Leonard, C.T. (1996) The effects of milling and processing wheat contaminated with ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants** 13: 141-153.

Oster, T., Jayyosi, Z., Creppy, E.E., El Hamri, H.S. and Batt, A-M. (1991) Characterization of pig liver purified cytochrome P-450 isoenzymes for ochratoxin A metabolism studies. **Toxicol. lett** 57: 203-214.

Patterson, D.S.P., Roberts, B.A. and Small, B.J. (1976) Metabolism of ochratoxin A and B in the pig during early pregnancy and the accumulation in body tissues of ochratoxin A only. **Food Cosmet. Toxicol** 14: 439-442.

Patterson, D.S.P., Shreeve, B.J., Roberts, B.A., Berrett, S., Brush, P.J., Glancy, E.M. and Krogh, P. (1981) Effect on calves of barley naturally contaminated with ochratoxin A and groundnut meal contaminated with low concentrations of aflatoxin B1. **Res. Vet. Sci** 31: 213-218.

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 additives and Contaminants**. 5: 299-301.

Petkova-Bocharova, T. and Castegnaro, M. (1991) Ochratoxin A and other mycotoxins in cereals from an area of Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. In M. Castegnaro., Plestina. R., Dirheimer. G., Chernozemsky. I.N. and Bartsch. H. (Eds) *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract tumours*, IARC Scientific Publications, Lyon, volume 115, pp 83-87.

Pfohl-Leszkowics, A., Chakor, K., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1991) DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H. (Eds) *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary tract tumours*, IARC Scientific Publications, Lyon, 115, pp 245-253.

Pfohl-Leszkowics, A., Grosse, Y., Kane, A., Gharbi, A., Baudrimont, I., Obrecht, S., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1993a) Is the oxydative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A? In E.E Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds) *Human ochratoxicosis and its pathologies*, John Libbey eurotext, volume 231, pp129-140.

Pfohl-Leszkowics, A., Grosse, Y., Obrecht, S., Kane, A., Castegnaro, M., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1993b) Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A exposure. In E.E Creppy, M. Castegnaro and G. Dirheimer (Eds) *Human ochratoxicosis and its pathologies*, John Libbey eurotext, volume 231, pp199-208.

Pfohl-Leszkowicz, A. (1994a) L'ochratoxine A, une mycotoxine ubiquitaire contaminant l'alimentation humaine. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales** 188, 335-353.

Pfohl-Leszkowics, A., Obrecht, S., Grosse, Y. and Dirheimer, G. (1994b) Involvement of antioxidants and inhibitors of glutathione conjugation in ochratoxin A genotoxicity in mice liver and kidney. **Toxicol. Lett** 74: S 65.

Phillips, T.D., Sarr, A.B., Clement, B.A., Kubena, L.F. and Harvey, R.B. (1990) Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. In *Mycotoxins, cancer and health*, Pennington Center Nutrition Series Vol 1, Louisiana State University Press, Baton Rouge, pp 223-237.

Pitout, M.J. (1969) The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. **Biochem. Pharmacol** 18: 1829-1836.

Pitt, J.I. (1987) *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. **Appl. Environ. Microbiol** 53: 266-269.

Plestina, R., Ceovic, S., Gatenbeck, s., Habazin-Novak, v., Hult, K., Hokby, E., Krogh, P. and Radik, B. (1990) Human exposure to ochratoxin A in areas of Yugoslavia with endemic nephropathy. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol** 10: 145-148.

Plestina, R. (1992) Some features of balkan endemic nephropathy. **Food. Chem. Toxicol** 30: 177-181.

Poelma, F.G.J., Breas, R. and Tukker, J.J. (1990) Intestinal absorption of drugs. III. The influence of taurocholate on the disappearance kinetics of hydrophilic and lipophilic drugs from the small intestine of the rat. **Pharm. Res** 7: 392-397.

Pohland, A.E., Nesheim, S. and Friedman, L. (1992) Ochratoxin: a review. **Pure and Appl. Chem** 64: 1029-1046.

Polli, J.E. and G.L. Amidon. 1995. In vitro characterization of sodium glycocholate binding to cholestyramine resin. **J. Pharmacol. Sci** 84: 55-61.

Poppenga, R.H., Lundeen, G.R., Beasley, V.R. and Buck, W.B. (1987) The assessment of a general therapeutic protocol for the treatment of acute T-2 toxicosis in swine. **Vet. Hum. Toxicol** 29: 237-239.

Prelusky, D.B. (1994) Residues in food products of animal origin. In J.D Miller and H.L Trenholm (Eds) *Mycotoxins in grain*, Eagan press, St-Paul, Mn, pp 405-420.

Price, R.G. (1992) Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. **Toxicology** 23: 99-134.

Purchase, I.F.K. and Van Der Watt, J.J. (1971) The long term toxicity of ochratoxin A to rats. **Food. Cosmet. Toxicol** 6: 479-483.

Radonic, M. and Radosevic, Z. (1992) Clinical features of balkan endemic nephropathy. **Food. Chem. Toxicol** 30: 189-192.

Rahimtula, A.D. Bereziat, J.C., Bussachini-Griot, V. and Bartsch, H. (1988) Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochem. Pharmacol** 37: 4469-4477.

Ramos, A.J., Fink-Gremmels, J. and Hernandez, E. (1996a) Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbents compounds. **J. Food. Prot** 59: 631-641.

Ramos, A.J., Hernandez, E., Pladelfina, J.M. and Merino, M. (1996b) Intestinal absorption of zearalenone and in vitro study of non-nutritive sorbent materials. **Intern. J. Pharm** 128: 129-137.

Ramos, A.J. and Hernandez, E. (1997) Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrate sodium calcium aluminosilicates addition to feedstuffs. **Anim. Feed. Sci. Technol** 65: 197-206.

Ribelin, W.E., Fukushima, K. and Still, P.E. (1978) The toxicity of ochratoxin A to ruminants. **Can. J. Comp. Med** 42: 172-176.

Roth, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Kane, A., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. **Toxicology** 48: 293-303.

Rotter, R.G., Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1989a) Ochratoxin A toxicity in growing chicks: effect of supplemental dietary phenylalanine. **Nutr. Rept. Inter** 40: 1091-1100.

Rotter, R.G., Frohlich, A.A. and Marquardt, R.R (1989b) Influence of dietary charcoal on ochratoxin A toxicity in leghorn chicks. **Can. J. Vet. Res** 53: 449-453.

Ruprich, J. and Ostry, V. (1993) Health risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A to humans. **Cent. Europ. J. Publ. Healt** 1: 86-93.

Rutqvist, L., Bjorklund, N.E., Hult, K., Hokby, E. and Carlsson, B. (1978) Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. **Appl. Environ. Microbiol.** 36: 920-925.

Sanyal, A.J., Hirsch, J.I. and Moore, E.W. (1994) Evidence that bile salts are important for iron absorption. **Am. J. Physiol.** 265 (Gastrointest. Liver Physiol. 29): G318- G323.

Saral, R. and J.L. Spratt. 1967. Alteration of oral digitoxin toxicity and its in vitro binding by cholestyramine. **Arch. Int. Pharmacodyn. Therapie** 167: 10-18.

Scott, P.M. (1984) Effects of food processing on mycotoxins . **J. Food Prot** 47: 489-499.

Scott, P.M. (1991) Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. In J. Chelkowski (ed) Cereal grain : Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Developments in Food Science, 26, Elsevier Sci. Publishers', Amsterdam, pp 529-572.

Scott, P.M. (1996a) Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. **Food Additives and Contaminants** 13: 19-21.

Scott, P.M. (1996b) Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. **J. AOAC. International** 79: 875-882.

Scott, P.M. (1998) Industrial and farm detoxification process for mycotoxins. **Rev. Med. Vet** 149: 543-548.

Scudamore, K.A. (1996) Ochratoxin A in animal feed-effects of processing. **Food Additives and Contaminants** 13: 39-52.

Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W. and Goulden, M.L. (1969) Ochratoxin A: occurrence as natural contaminant of a corn sample. **Appl. Microbiol** 17: 765-766.

Shreeve, B.J., Patterson, D.S.P., Pepin, G.A., Roberts, B.A. and Wrathall, A.E. (1977) Effect of feeding ochratoxin to pigs during early pregnancy. **Brit. Vet. J** 133: 412-417.

Shreeve, B.J., Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A. (1979) The carry over of aflatoxin, ochratoxin and zearalenone from naturally contaminated feed to tissues, urine and milk of dairy cows. **Food. Cosmet. Toxicol** 17: 151-152.

Sigrid, H. and Hult, K. (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma binding properties. **J. Appl. Toxicol** 9: 91-96.

Sokol, P.P., Ripich, G., Holohan, P.D. and Ross, C.R. (1988) Mechanism of ochratoxin A transport in kidney. **J. Pharmacol. Exp. Ther** 246: 460-465.

Speijers, G.J.A. and van Egmond, H.P. (1993) Worldwide ochratoxin A levels in food and feed. In E.E. Creppy, M. Categnaro, G. Dirheimer (Eds) Human ochratoxicosis and its pathologies, Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd, 231, pp 85-100.

Sreemannarayana. O., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Marquardt, R.R. and Abramson, D. (1988) Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. **J. Anim. Sci** 66: 1703-1711.

Stefanovic, V. and Polenakovic, M.H. (1991) Balkan nephropathy. **Am. J. Nephrol** 11: 1-11.

Stein, A.F., Phillips, T.D., Kubena, L.F. and harvey, B.B. (1985) Renal secretion and reabsorption as factors in ochratoxicosis: effect of probenecid on nephrotoxicity. **J. Toxicol. Environ Health** 16: 593-605.

Steyn, P.S. (1984) Ochratoxins and related dihydro-iso-coumarins. In: Betina, V. (Ed) Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification, Amsterdam, Oxford, New york, Elsevier Science Publishers, pp 183-216.

Steyn, P.S. (1993) mycotoxins of human health concern. In In E.E. Creppy, M. Categnaro, G. Dirheimer (Eds) Human ochartoxicosis and its pathologies, Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd, 231, pp 3-31.

Stojkovic, R., Hult, K., Gamulin, S. and Plestina, R. (1984) High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. **Biochem. Int** 9: 33-38.

Storen, O., Holm, H. and Stormer, F.C. (1982) Metabolism of ochratoxin A by rats. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 785-789.

Stormer, 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 rat liver microsomes from various species. **Appl. Environ. Microbiol** 42: 1051-1056.

Stormer, F.C., Storen, O., Hansen, C.E., Pedersen, J.I., Hvistendahl, G. and Aasen, A.J. (1983) Formation of (4R) and (4S) -4-hydroxyochratoxin and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. **Appl. Environ. Microbiol** 45: 1183-1187.

Stormer, F.C., Kolsaker, P., Holm, H., Rogstad, S. And Elling, F. (1985) Metabolism of ochratoxin B and its possible effects upon the metabolism and toxicity of ochratoxin A in rats. **Appl. Environ. Microbiol** 49: 1108-1112.

Stormer, C.S. (1992) Ochratoxin A- a mycotoxin of concern. In D. Bhatnagar, E.B. Lillehoj and D.K. Arora (Eds) Handbook of Applied Mycology Volume 5: Mycotoxins in Ecological Systems., New York. Basel. Hong Kong, Marcel Dekker, Inc, pp 403-432.

Stormer, C.S. and Lea, T. (1995) effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. **Toxicology** 95: 45-50.

Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J. And Schlatter, C. (1995) The occurrence of ochratoxin A in coffee. **Food. Chem. Toxicol** 33: 341-355.

Suzuki, S., Kozuka, Y. Satoh, T. and Yamazaki, M. (1975) Studies on the nephrotoxicity of ochratoxin A in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 34: 479- 490.

Suzuki, S., Moroi, K., Kanisawa, M. and Satoh, T. (1986) Effect of drug metabolizing enzymes inducers on carcinogenesis and toxicity of ochratoxin A in mice. **Toxicol. Lett** (suppl 31): 206.

Szczech, G.M., Carlton, W.W. and Tuite, J. (1973) Ochratoxicosis in beagle dogs. I Clinical and clinicopathological features. **Vet. Pathol** 10: 135-154.

Tanchev, V., Evstatiev, T., Dorosiev, D., Pencheva, Z. and Zsvetkov, G. (1956) Study of nephritis in the region of Vratza (in Bulgaria). **Savr. Med** 9: 14-29.

Thompson, W.G (1971) Cholestyramine. **C.M.A Journal** 104, 305-309.

Thuvander, A., Funseth, E., Breitholtz-Emanuelson, A., hallen, I.P. and Oskarsson, A. (1996) Effects of ochratoxin A on the rat immune system after prenatal exposure. **Natural. Toxins** 4: 141-147.

Turner, W.B. (1971) Fungal metabolites. Accademic Press, New York.

Ueno, Y. and Kubota, K. (1976) DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. **Cancer Res** 36: 445-445.

Ueno, Y. (1985) Biotransformation of mycotoxins in the reconstituted cytochrome P-450 system. **Proc. J. Assoc. Mycotoxicol** 22: 28-30.

Ullrich, K.J., Rumrich, G., Gemborys, M.W. and Dekant, W. (1991) Renal transport and nephrotoxicity. In P.H. Bach, N.J. Gregg, M.W. Wilks and L. Delacruz (Eds) Nephrotoxicity, Dekker, London, pp 1-8.

Umeda, M., Tsutsui, T. and Saito, M. (1971) Mutagenicity and inducibility of DNA single- strands breaks and chromosom abberations by various mycotoxins. **Gann** 68: 619-625.

Underhill, K.L., B.A. Rotter, B.K. Thompson, D.B. Prelusky, and H.L. Trenholm 1995. Effectiveness of cholestyramine in the detoxification of zearalenone as determined in mice. **Bull. Environ. Contam. Toxicol** 54: 128-134.

Vadi, H.V., Schasteen, C.S. and Reed, D.J. (1985) Interaction of S-(2-haloethyl)-mercapturic acid analogs with plasmid DNA. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 80: 386-395.

Van Egmond, H.P. (1991) Worldwide regulations for ochratoxin A. In M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I.N. Chernozemsky and H. Bartsch. (Eds) *Mycotoxin, Endemic Nephropathy and urinary tract tumours*, volume 215, Lyon, pp 331-336.

Van Bladeren, P.J., Breimer, D.D., Rotteveel-Smijs, G.M.T., Jong, R. A., Buijs, W., Van Der Gen, A. and Mohn, G. R. (1980) The role of glutathione conjugation in the mutagenicity of 1,2-dibromomethane. **Biochem. Pharmacol** 29: 2975-2982.

Van Waalbeck, W., Scott, P.M. and Harwig, J. (1969) *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. **Can. J. Microbiol** 15: 1281-1285.

Van Der Merwe, K.J., Steyn, P.S. and Fourie, L. (1965) Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. **J. Chem. Soc** 1965: 7083-7088.

Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Téren, J. and Kozakiewicz, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* Species. **Appl. Environ. Microbiol** 62: 4461-4464.

Vukelic, M., Sostaric, B. and Belicza, M. (1992) Pathomorphology of balkan endemic nephropathy. **Food. Chem. Toxicol** 30: 193-200.

Wedeen, R.P. (1991) Environmental renal disease: lead, cadmium and Balkan endemic nephropathy. **Kidney Int** 40 (suppl): S4-S8.

Wei, Y.H., Lu, C.Y., Lin, T.N. and Wei, R.D. (1985) Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxydative phosphorylation. **Toxicology** 36: 119-130.

Wu, G., Brown, G.R. and St-Pierre, L. E. (1996) Polymeric sorbents for bile acids. 5. Polyacrylamide resins with ammonium-containing pendants. **Langmuir** 12: 466-471.

Xiaohong, C., Grant, J.W. D. and Wiedmann, T.S. (1997) Analysis of the solubilisation of steroids by bile salt micelles. **J. Pharm. Sci** 86: 372-377.

Yamamoto, A., Uchiyama, T., Nishikawa, R., Fujita, T. and Muranishi, S. (1996) Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers in the rat small intestine: Effects of absorption enhancers on the intestinal absorption of phenol red and the release of protein and phospholipids from the intestinal membrane. **J. Pharm. Pharmacol** 48: 1285-1289.

Zhu, X.X., G.R. Brown, and L.F. St-Pierre. 1992. Polymeric sorbents for bile acids. I: comparison between cholestyramine and colestipol. **J. Pharm. Sci** 81: 65-69.

Zimmerli, B and Dick, R. (1996) Ochratoxin A in table wine and grape juice. Occurrence and risk assessment. **Food. Additives and Contaminants** 13: 655-668.

Zingerle, M., Silbernagl, S. and Gekle, M. (1997) Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. **J. Pharma. Exper. Therapeu.** 280: 220-224.

ANNEXE 1

But: Étude préliminaire sur le rôle de l'interruption de la circulation entérohépatique dans l'absorption de l'OTA par le rat. Dans cette première étude, la circulation entérohépatique a été interrompue pendant 18 heures avant le gavage, afin d'épurer complètement le "pool" des acides biliaires. Les rats étaient divisés en 4 groupes: groupe 1 (Contrôle), groupe 2 ("sham"; contrôler le stress de la chirurgie), groupe 3 (Per fed 3g de diète /jour pour contrôler l'effet du jeun vu l'interruption de la circulation entérohépatique pendant 18 heures a entraîné une diminution de l'ingestion alimentaire) et groupe 4 (fistule biliaire implantée pendant 18 heures et maintenu jusqu'à la fin de l'expérience). Les rats avaient reçu de l'OTA par gavage (5mg/kg PC) le lendemain de la chirurgie.

Les résultats obtenus avaient montré que l'implantation de la fistule pendant 18 heures avait entraîné une diminution de l'ingestion alimentaire ainsi que le gain de poids des animaux comparé au groupe contrôle et au "sham" (Tableau 1 et 2).

La concentration de l'OTA plasmatique dans le groupe de fistule biliaire est plus élevée que dans le groupe contrôle et le "sham" (Tableau 3). Afin de vérifier l'importance du jeun dans l'augmentation de la concentration plasmatique en OTA, nous avons soumis les rats à un jeun (3g de diète/jour) qui avait débuté 1 jour avant le gavage par l'OTA et avait été poursuivi jusqu'à la fin l'expérience. Les résultats obtenus indiquent aussi une diminution dans le gain du poids et une élévation de la concentration de l'OTA dans le plasma comparé au contrôle et au "sham" .

Tableau 1: **Effets des différents traitements sur le poids corporel**

	jour 1	jour 2	jour 3
Contrôle	236±22	256 ± 16	245±12
“Sham”	241±12	236±16	230±13
“Per fed”	232±3	222±2	175±4
Fistule biliaire	257±2	229±1	231±3

“Sham”: groupe ayant subi une ouverture et une fermeture de l'abdomen sans fistule.

“Per fed”: groupe soumis à un jeûne (3g de diète/jour).

Fistule biliaire: groupe ayant subi une interruption de la circulation entérohépatique de 18 heures et qui a été conduite jusqu'à la fin de l'expérience.

Contrôle: groupe sans chirurgie et sans jeûne.

L'OTA avait été administrée par gavage (5mg/kg PC) 24 heures après la chirurgie. Le sang avait été prélevé à 3, 8 et 24 heures après le gavage.

Jour 1: jour de la chirurgie

Jour2: jour du gavage avec l'OTA

Jour 3: 24 heures après le gavage

Tableau 2: **Effets des différents traitements sur l'ingestion alimentaire**

	IA1	IA2	IA3
Contrôle	23 ± 2	11 ± 1	14 ± 1
"Sham"	23±4	11±5	7±3
"Per fed"	24±1	3	3
Fistule biliaire	24±1	3±1	3±1

IA: ingestion alimentaire en g/jour

IA1: jour de chirurgie

IA2: jour du gavage avec l'OTA

IA3: 24 heures après le gavage

Tableau 3: **Effets des différents traitements sur la concentration de l'OTA dans le plasma ($\mu\text{g/ml}$)**

Temps	Plasma OTA ($\mu\text{g/ml}$)		
	3 h	8 h	24 h
Groupe			
Contrôle	7.9 ± 2.1	6.2 ± 1	7.6 ± 0.6
"Sham"	9.3 ± 0.7	5.2 ± 0.5	4.8 ± 0.3
"Per Fed"	$12.9 \pm 0.9_{a,b}$	$21.2 \pm 1.1_{a,b}$	$21.8 \pm 2.1_{a,b}$
Fistule biliaire	$12.5 \pm 2.2_{a,b}$	$10.5 \pm 2.2_{a,b}$	$12.9 \pm 1.6_{a,b}$

* $p < 0.05$

a: Différence significative par rapport au contrôle

b: Différence significative par rapport au Sham

ANNEXE 2

Rôle de la supplémentation par l'acide cholique dans l'absorption de l'OTA par le rat.

Methodologie

Étude préliminaire

Dans le but de déterminer si une supplémentation de trois jours avec l'acide cholique était suffisante pour augmenter significativement le pool des AB. Nous avons soumis des rats à une diète supplémentée avec l'acide cholique (200 μ mol/jour) pendant 3 jours. Un groupe contrôle a aussi été utilisé. Au jour 3, la bile était collecté dans des tubes pre-pesés et maintenus dans de la glace pendant 30 min. Le volume de la bile est déterminé en assumant une densité de 1 g/ml. Le débit biliaire a été exprimé en μ l/min. g foie et la concentration en AB déterminée par la methode enzymatique.

Les résultats obtenus montrent que l'addition de l'acide cholique dans la diète augmente significativement le débit biliaire (2.5 X) par rapport au contrôle (2.9 \pm 0.3 vs 1.1 \pm 0.2 μ l/min. g foie). La sécrétion exprimée en nmole/ min. g foie est six fois plus élevée dans le groupe supplémenté comparé au contrôle (248 \pm 19 vs 42 \pm 2 nmole/min. g foie).

Etude expérimentale

Les rats étaient alimentés avec une diète supplémentée avec l'acide cholique (200 μ mol/jour) donnée 3 jours avant le gavage et 1 jour après. Au jour 3, les rats ont reçu de l'OTA par gavage (5mg/kg PC) Les échantillons de sang étaient prélevés à différents temps: 30 min, 1, 3, 8 et 24h après intubation. Un groupe contrôle a été utilisé dans les mêmes conditions. La concentration d'OTA a été déterminée par HPLC.

Les résultats démontrent une augmentation de l'absorption de l'OTA en fonction du temps (5.2 \pm 0.8 à 30 min et 9.1 \pm 1.3 μ g/ml à 24 h). La concentration maximale a été observé à 24 h. On a noté une différence significative dans l'absorption de l'OTA entre le groupe contrôle et le groupe supplémenté 24 heures après le gavage . D'une façon générale, une supplémentation de la diète par l'acide cholique n' a pas augmenté l'absorption de l'OTA comparé au contrôle.

Tableau 1: Effet de l'addition de l'acide cholique sur la concentration d'OTA dans le plasma ($\mu\text{g/ml}$)

Temps	Plasma OTA ($\mu\text{g/ml}$)				
	30 min	1 h	3 h	8 h	24 h
Groupe					
Contrôle	4.6 \pm 0.8	4.8 \pm 1.3	7.9 \pm 2.1	6.2 \pm 1	7.6 \pm 0.6
Supplémenté avec l'acide cholique	5.2 \pm 0.8	6.5 \pm 0.8	6.7 \pm 1.2	7.3 \pm 1.3	9.1 \pm 1.3 ^{*a}

* $p < 0.05$

^a: Différence significative par rapport au groupe contrôle.

OTA (5 mg/kg par gavage)

L'acide cholique donnée dans la diète (200 $\mu\text{mole/jour}$) pendant 4 jours (3 jours avant le gavage et 1 jour après).