



HAL
open science

Ochratoxine A et aliments : quel risque pour la santé humaine ?

Laurent Bertrand

► **To cite this version:**

Laurent Bertrand. Ochratoxine A et aliments : quel risque pour la santé humaine ?. Sciences pharmaceutiques. 2002. dumas-01396566

HAL Id: dumas-01396566

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01396566>

Submitted on 15 Nov 2016

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1er exemplaire

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNÉE: 2002

N° 7026

OCHRATOXINE A ET ALIMENTS : Quel risque pour la santé humaine ?

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

BERTRAND Laurent

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À L' UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE (UJF)

Le : 4 juillet 2002

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury : Dr Serge KRIVOBOK

Membres : Dr Annick VILLET

Dr Sylviane DRAGACCI



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNÉE: 2002

N° 7026

OCHRATOXINE A ET ALIMENTS :
Quel risque pour la santé humaine ?

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

BERTRAND Laurent

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À L' UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE (UJF)

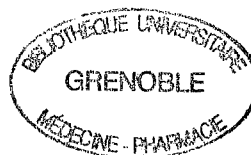
Le : 4 juillet 2002

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury : Dr Serge KRIVOBOK

Membres : Dr Annick VILLET

Dr Sylviane DRAGACCI



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNÉE: 2002

N°

OCHRATOXINE A ET ALIMENTS :
Quel risque pour la santé humaine ?

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

BERTRAND Laurent

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À L' UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE (UJF)

Le : 4 juillet 2002

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury : Dr Serge KRIVOBOK

Membres : Dr Annick VILLET

Dr Sylviane DRAGACCI

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	<i>Josette</i>	<i>Chimie Analytique</i>
BAKRI	<i>Abdelaziz</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>
BENOIT-GUYOD	<i>Jean-Louis</i>	<i>Chimie Toxicologie et Ecotoxicologie</i>
CALOP	<i>Jean</i>	<i>Pharmacie Clinique et Biotechnique</i>
CUSSAC	<i>Max</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
DECOUT	<i>Jean-Luc</i>	<i>Chimie Générale</i>
DEMENGE	<i>Pierre</i>	<i>Physiologie et Pharmacologie</i>
DROUET	<i>Emmanuel</i>	<i>Microbiologie-immunologie</i>
FAVIER	<i>Alain</i>	<i>Biochimie</i>
GOULON	<i>Chantal</i>	<i>Physique-Pharmacie</i>
GRILLOT	<i>Renée</i>	<i>Parasitologie</i>
MARIOTTE	<i>Anne-Marie</i>	<i>Pharmacognosie</i>
RIBUOT	<i>Christophe</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie</i>
ROUSSEL	<i>Anne-Marie</i>	<i>Biochimie</i>
SEIGLE-MURANDI	<i>Françoise</i>	<i>Botanique et Cryptogamie</i>
STEIMAN	<i>Régine</i>	<i>Biologie Cellulaire</i>
WOUESSIDJEWÉ	<i>Denis</i>	<i>Pharmacie Galénique</i>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	<i>Delphine</i>	<i>Parasitologie</i>
ALLENET	<i>Benoît</i>	<i>Pharmacie Clinique</i>
BARTOLI	<i>Marie-Hélène</i>	<i>Pharmacie Clinique et Biotech.</i>
BOUMENDJEL	<i>Ahcène</i>	<i>Pharmacognosie</i>
BURMEISTER	<i>Wilheim</i>	<i>Physique</i>
CARON	<i>Cécile</i>	<i>Biologie Moléculaire</i>
CHARLON	<i>Claude</i>	<i>Chimie Pharmacie</i>
DELETRAZ	<i>Martine</i>	<i>Droit Economie pharmaceutique</i>
DIJOUX-FRANCA	<i>M. -Geneviève</i>	<i>Pharmacognosie</i>
DURMORT-MEUNIER	<i>Claire</i>	<i>Virologie moléculaire structur</i>
ESNAULT	<i>Danielle</i>	<i>Chimie Analytique</i>
FAURE	<i>Patrice</i>	<i>Biochimie C</i>
FAURE-JOYEUX	<i>Marie</i>	<i>Physiologie-Pharmacologie.</i>
FOUCAUD-GAMEN	<i>Jacqueline</i>	<i>Bactériologie-Virologie.</i>
GEZE	<i>Annabelle</i>	<i>Pharmacotechnie Galénique</i>
GILLY	<i>Catherine</i>	<i>Chimie Thérapeutique</i>
GUIRAUD	<i>Pascale</i>	<i>Biologie cellulaire</i>
GROSSET	<i>Catherine</i>	<i>Chimie analytique</i>
HININGER-FA VIER	<i>Isabelle</i>	<i>LBSO-Biochimie C</i>
KRIVOBOK	<i>Serge</i>	<i>Botanique- Cryptogamie</i>
MORAND	<i>Jean-Marc</i>	<i>Chimie thérapeutique</i>
NICOLLE	<i>Edwige</i>	<i>Chimie organique</i>
PERA	<i>Marie-Hélène</i>	<i>Chimie organique</i>
PEYRIN	<i>Eric</i>	<i>Chimie Analytique Alimentaire</i>
PINEL	<i>Claudine</i>	<i>Parasitologie</i>
RAVEL	<i>Anne</i>	<i>Chimie Analytique</i>
RIBUOT	<i>Diane</i>	<i>Physio. Pharmaco</i>
RICHARD	<i>Jean-Michel</i>	<i>Chimie Toxico-Ecotoxicologie</i>
RIONDEL	<i>Jacqueline</i>	<i>Physiologie Pharmacologie</i>
TAILLANDIER	<i>Georges</i>	<i>Chimie organique</i>
VILLEMAIN	<i>Danièle</i>	<i>Physique Pharmacie</i>
VILLET	<i>Annick</i>	<i>Chimie analytique</i>

REMERCIEMENTS

Je remercie mon Président de thèse, **Monsieur le Docteur Krivobok** qui m'a fait l'honneur de guider mon travail et de présider cette thèse. Merci pour sa disponibilité, sa patience et sa générosité tout au long de ces années d'études.

Je remercie plus particulièrement, **Madame le Docteur Dragacci** qui m'honore de sa présence au sein de ce jury. Merci pour son aide précieuse, ses conseils éclairés et son dévouement.

Je remercie également, **Madame le Docteur Villet** pour ses compétences et sa présence afin de juger ce travail.

À Pauline

Pour que son futur soit plus sûr.

À Laurence

Pour son soutien moral et son immense patience.

À mes parents.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

1. Généralités	4
1-1. Structure physique et chimique de l'ochratoxine A	4
1-1.1. Structure de l'ochratoxine A	4
1-1.2. Autres ochratoxines	5
1-2. Propriétés physiques et chimiques de l'ochratoxine A	6
1-3. Biosynthèse	7
1-3.1. Facteurs influençant la biosynthèse de l'OTA	9
1-3.1.1. Activité en eau et température	9
1-3.1.2. pH	11
1-3.1.3. Les nutriments	11
1-4. Absorption, distribution, métabolisme et élimination de l'OTA	12
2. Toxicité de l'ochratoxine A	14
2-1. Néphrotoxicité	14
2-2. Immunotoxicité	16
2-3. Tératogénicité	17
2-4. Génotoxicité	18
2-5. Potentialisation de la toxicité de l'ochratoxine A par la citrinine	21
2-6. La néphropathie endémique des Balkans	21
3. Sources et présence de l'ochratoxine A	25
3-1. Souches fongiques productrices d'ochratoxine A	25
3-1.1. Genre <i>Aspergillus</i>	25
3-1.2. Genre <i>Penicillium</i>	27
3-2. Contamination des denrées d'origine végétale par l'ochratoxine A	29
3-2.1. Céréales et dérivées	29
3-2.2. Graines	30
3-2.3. Raisins et dérivés	31
3-2.4. Autres aliments	33
3-3. Contamination des denrées d'origine animale par l'ochratoxine A	34
3-4. Contamination de l'homme par l'ochratoxine A	36
3-4.1. Exposition de l'être humain par l'ochratoxine A	36
3-4.2. Estimation de l'ingestion d'ochratoxine A	38
3-4.3. Détoxification	40
4. Les différentes méthodes d'analyses	43
4-1. Les méthodes immunochimiques	44
4-2. Exemple d'immunopurification de l'ochratoxine A par test industriel	45

4-3. Les méthodes physico-chimiques	46
4-3.1. La chromatographie sur couche mince	46
4-3.2. La chromatographie liquide haute performance	46
5. Législation sur l'ochratoxine A	50
5-1. Organismes internationaux	50
5-2. Normes européennes et étrangères	50
6. Stratégie et méthode de prévention et/ou décontamination	54
6-1. Méthodes de décontamination	54
6-2. Méthodes de prévention	57

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

GLOSSAIRE

ANNEXES

INTRODUCTION

Métabolites secondaires de champignons microscopiques nommés micromycètes, les mycotoxines sont nombreuses (plus de 300), plus ou moins toxiques et hétérogènement réparties dans l'alimentation humaine. Depuis cinquante ans, on entend parler des aflatoxines, de leur présence dans le lait, de leur toxicité chez l'humain, mais on oublie parfois de parler des autres mycotoxines de l'alimentation qui ont un intérêt scientifique de plus en plus croissant :

- la patuline produite par plusieurs moisissures, principalement *Penicillium expansum* Link (Pfohl-Leszkowicz, 1999a) ;
- les fumonisines, groupe de toxines fongiques caractérisées en 1988 (Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 1999a) chez *Fusarium moniliforme* Sheldon ;
- la zéaralénone, mycotoxine produite par *Fusarium graminearum* Schwabe (Pfohl-Leszkowicz, 1999b) ;
- les trichotécènes constituant un groupe de métabolites secondaires issus de *Fusarium roseum* Link (Betina, 1989a) ;
- et bien-sûr les ochratoxines qui sont l'objet de ce mémoire.

En 1965, une mycotoxine nommée ochratoxine A fut découverte dans des céréales moisies (Scott, 1965 ; Van der Merwe *et coll.*, 1965). Lors des épidémies de néphropathies porcines de 1963 et 1971 au Danemark, une corrélation entre teneur en humidité, présence d'ochratoxine A dans les céréales et dans 35 % des reins de porcs atteints de néphropathie a été établie (Krogh, 1976a ; 1976b ; 1977).

Depuis, plusieurs types d'ochratoxines (OT) ont été mis en évidence, mais les chercheurs s'intéressent plus particulièrement au type A (OTA) que l'on retrouve en quantité non négligeable dans l'alimentation humaine. Celle-ci est impliquée dans l'étiologie de « la néphropathie

endémique des Balkans » des années 1950 (Pavlovic *et coll.*, 1979), et se retrouve principalement dans les céréales et aliments que nous consommons quotidiennement.

En 1993, le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) édita une monographie complète sur l'OTA. Ces travaux permirent sa classification dans le groupe 2B défini comme suit : « L'agent (le mélange) est peut-être cancérigène pour l'homme. Le mode d'exposition à cet agent entraîne des expositions qui sont peut-être cancérigènes pour l'homme » (IARC, 1993).

Mais depuis ces 3 dernières années, la publication d'études sur la génotoxicité de l'OTA se multiplie et il semblerait que cette mycotoxine, dans l'alimentation, devienne un problème beaucoup plus important qu'en l'on ne pensait pour la santé publique.

Ainsi, plusieurs magazines grand public dont notamment 60 MILLIONS DE CONSOMMATEURS (Janvier 2001) et QUE CHOISIR (Sokolsky, 2002 ; Humbert, 2001 ; Maleysson, 2001), se font régulièrement l'écho de la contamination ou non, des produits destinés à l'alimentation humaine commercialisés en France.

Nous allons donc essayer de comprendre, par la mise à jour des connaissances sur l'OTA (caractéristiques, toxicité, présence dans l'alimentation) s'il existe un risque réel de cette mycotoxine en terme de santé publique et quelles sont alors les mesures réglementaires et prophylactiques mises en place pour prévenir ce risque.

CHAPITRE 1

GÉNÉRALITÉS

Les ochratoxines A (OTA), B (OTB) et C (OTC) sont des métabolites secondaires issus de micromycètes mais ne possèdent pas toutes une activité toxicologique et une fréquence de contamination importante (Hölher, 1998 ; Biro *et coll.*, 2002). Seule l'ochratoxine A a démontré une toxicité cellulaire et une grande fréquence de contamination tandis que OTB (moins toxique que OTA (Moss, 1996) et OTC (absence de toxicité) sont peu rencontrées dans l'alimentation. De ce fait, ce travail se polarisera sur l'ochratoxine A.

1-1. Structures physique et chimique de l'ochratoxine A

1-1.1. Structure de l'ochratoxine A

La structure de l'OTA a été élucidée par synthèse (Steyn et Holzapfel, 1967 ; Roberts et Woollven, 1970), elle est formée de la 7-carboxy-5-chloro-8-carboxy-3,4-dihydro-9-hydroxy-3-méthylisocoumarine (ochratoxine α) relié à la L- β -phénylalanine par l'intermédiaire d'une liaison amide.

Voici les désignations officielles de l'ochratoxine A (IARC, 1993 ; Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 1999b).

N° de C.A.S. : 303-47-9

Nom de C.A.S. : L-phénylalanine, N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)-carbonyl]-, (R)-

No de l'UICPA: N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-7-isochromanyl]carbonyl]-3-phényl-L-alanine.

Synonyme : (-)-N-[(5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-7-isochromanyl) carbonyl]-3-phénylalanine.

De masse molaire $M = 403,8 \text{ g.mole}^{-1}$, sa formule brute est $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$ et sa formule développée est représentée ci-dessous (Figure n°1).

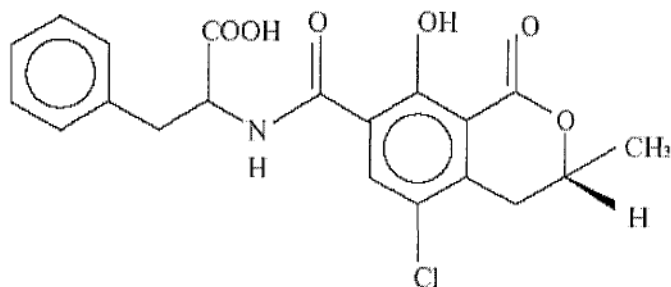


Figure 1: Structure de l'ochratoxine A.

1-1.2. Autres ochratoxines

L'ochratoxine A fait partie d'une famille de mycotoxines comprenant les ochratoxines B et C qui sont respectivement l'analogue déchloré et l'ester éthylique. L'acide carboxylique d'isocoumarine (ochratoxine α) et son analogue déchloré (ochratoxine β) sont également décelables dans des cultures de souches productrices d'ochratoxine A d'*Aspergillus* sp. et de *Penicillium* sp. (Höhler, 1998).

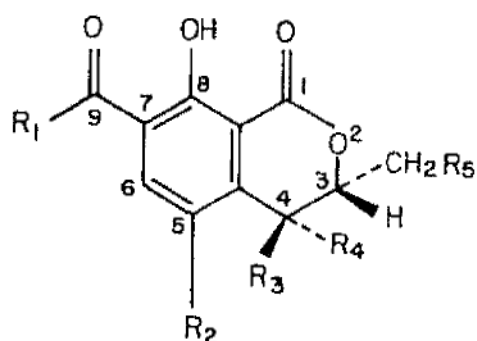


Figure 2: Structure générale de l'ochratoxine. Se reporter au tableau 1 pour les structures des différents groupes R.

Nom	R1	R2	R3	R4	R5
Ochratoxines naturelles					
Ochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	Phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine C	Ester éthylique, phénylalanine	Cl	H	H	H
Ester méthylique ochratoxine A	Ester méthylique, phénylalanine	Cl	H	H	H
Ester méthylique ochratoxine B	Ester méthylique, phénylalanine	H	H	H	H
Ester éthylique ochratoxine B	Ester éthylique, phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine α	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β	OH	H	H	H	H
4R-Hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	OH	H
4-S-Hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	OH
Analogue tyrosine de l'ochratoxine A	Tyrosine	Cl	H	H	H
Analogue sérine de l'ochratoxine A	Sérine	Cl	H	H	H
Analogue hydroxyproline de l'ochratoxine A	Hydroxyproline	Cl	H	H	H
Analogue lysine de l'ochratoxine A	Lysine	Cl	H	H	H
Ochratoxines synthétiques					
d-Ochratoxine A	d-Phénylalanine	Cl	H	H	H
Amide éthylique d'ochratoxine A	Amide éthylique, phénylalanine	Cl	H	H	H
O-méthyl Ochratoxine A	Phénylalanine, OHCH ₃ en C-8	Cl	H	H	H
Lactone ouvert Ochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	-

Tableau 1: Désignation des ochratoxines en fonction des différents groupements R1, R2, R3, R4 et R5 de la figure 2 (Höhler, 1998).

1-2. Propriétés physiques et chimiques de l'ochratoxine A

L'ochratoxine A est un composé cristallin incolore à blanc. Elle possède une intense fluorescence en lumière UV, de couleur verte en milieu acide et de couleur bleue en milieu alcalin (Budavari, 1989 ; IARC, 1993).

Les points de fusion de l'OTA cristallisée sont respectivement dans le benzène et le xylène de 90 et 169°C (Van der Merwe *et coll.*, 1965 ; Kuiper-Goodman et Scott, 1989).

Son pouvoir rotatoire dans le chloroforme est $[\alpha]_D^{21} = -46,8^\circ$ avec $c = 2,65$ mMole (Pohland *et coll.*, 1982).

Pour son spectre d'absorption UV, l'ochratoxine A affiche un coefficient d'absorption molaire dans le méthanol de :

$$\xi(\lambda 214) = 3720 \pm 55$$

$$\xi(\lambda 282) = 89 \pm 6$$

$$\xi(\lambda 332) = 633 \pm 7$$

L'ochratoxine A absorbe en infra-rouge, pour les groupements carboxyl ($\nu_{\max} = 1721 \text{ cm}^{-1}$), amide secondaire ($\nu_{\max} = 1657 \text{ cm}^{-1}$) et lactone ($\nu_{\max} = 1675 \text{ cm}^{-1}$) (Pohland *et coll.*, 1982).

L'ochratoxine A se dissout complètement dans une solution aqueuse de NaHCO_3 , est très soluble dans les solvants organiques polaires mais peu dans l'eau (Steyn, 1984). L'acide libre de l'ochratoxine A (ochratoxine α) obtenu par hydrolyse de la liaison amide est quant à elle, modérément soluble dans ces mêmes solvants organiques (IARC, 1993).

1-3. Biosynthèse de l'ochratoxine A

L'ochratoxine A est composé de 2 éléments distincts, la L- β -phénylalanine et l'ochratoxine α . La L- β -phénylalanine est synthétisée par la voie shikimique des acides aminés. L'administration de précurseurs marqués au ^{14}C et la méthode de dégradation chimique ont permis d'élucider la synthèse de l'ochratoxine α . Il s'agit de cinq unités acétate et d'une addition de carbone en C-7 provenant de la méthionine et formant un cycle dihydrocoumarinique (Searcy *et coll.*, 1969 ; Steyn *et coll.*, 1970). La figure 3 montre les différentes étapes de la synthèse de l'OTA.

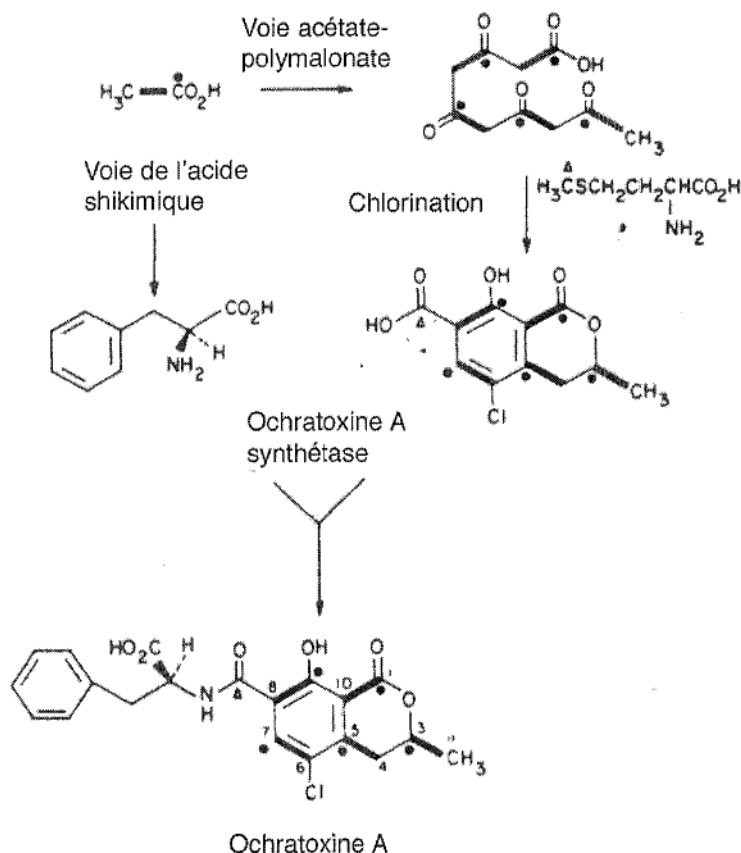


Figure 3: Voie biochimique de la synthèse de l'ochratoxine A (Steyn, 1984).

Harris et Mantle (2001), ont confirmé que la voie principale de synthèse de l'OTA passait par la formation de l'ochratoxine β puis la chloration de celle-ci (par une chloroperoxydase) en $\text{OT}\alpha$ et enfin l'incorporation par une liaison peptidique à la phénylalanine pour donner l'OTA. La chloration de l'ochratoxine B ($\text{OT}\beta$) en OTA est une voie quasi inexistante par contre la déchloration de l'OTA en $\text{OT}\beta$ est possible (Harris et Mantle, 2001).

1-3.1. Facteurs influençant la biosynthèse de l'OTA

1-3.1.1. Activité en eau et température.

L'activité en eau (a_w) et la température sont les éléments déterminants dans la production d'ochratoxine A. Le tableau 2 donne les concentrations d'OTA produites par les souches fongiques en fonction de ces deux paramètres.

Activité en eau (a_w)	Production d'OTA (mg/kg) à 15 °C	Production d'OTA (mg/kg) à 22°C	Production d'OTA (mg/kg) à 30°C
0,852	0	0	50
0,901	0	46	111
0,953	36	201	302
0,997	81	156	218

Tableau 2: Production d'ochratoxine A (en mg/kg) par *Aspergillus ochraceus* Wilhem pour diverses valeurs de a_w et de température après 2 semaines d'incubation (d'après Bacon et coll., 1973).

Les températures minimale, optimale et maximale de production pour *Aspergillus ochraceus* sont respectivement de 12, 28 et 37 °C. L'activité minimale en eau pour la production d'OTA est comprise entre 0,83 et 0,87.

Il existe au sein du genre *Penicillium* des espèces psychrophiles telles que *P. viridicatum* Westling qui synthétisent cette mycotoxine dès 4 °C. Sa température optimale de production se situe à 24 °C avec une teneur en eau de 0,95 (Tableau 3).



Activité en eau :		Production d'OTA en mg/kg		
a_w	5 °C	12°C	25°C	
0,85-0,86		4.000	11.000	
0,90-0,93		160.000	280.000	
0,95-0,97	17.000			

Tableau 3 : Production d'ochratoxine A (en mg/kg) par *Penicillium viridicatum* pour diverses valeurs de a_w et de température après 3 semaines d'incubation (d'après Harwig et Chen, 1974).

Dans les régions froides, l'ochratoxine A est plutôt produite par *P. viridicatum* alors que dans les régions chaudes, ce seraient plutôt les *Aspergilli* qui la produisent (Krogh, 1987 ; Pittet, 1998 ; Com. du codex alimentarius, 2002a). Dans des conditions de stockage, les espèces *Eurotium*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus fréquemment rencontrées. *Eurotium* et *Aspergillus* sont les plus tolérantes vis-à-vis des conditions de stockage, et l'humidité relative pour leur croissance est de 14-15 % dans les petites graines (blé, avoine, orge et seigle) à une température comprise entre 20 et 35 °C (Com. du codex alimentarius, 2002a).

Penicillium sp. nécessite une humidité relative plus élevée pour croître, l'humidité minimum étant par exemple de 16-17 % pour *P. verrucosum* Dierckx. Quant à la production d'ochratoxine A, elle débiterait dès que l'humidité relative dépasse d'un pour cent celle nécessaire à la croissance fongique (Jonsson et Petterson, 1999).

Dans une étude demandée par le ministère anglais de l'agriculture, il a été montré un risque potentiel de contamination par l'ochratoxine A sur des grains d'orge stockés à une humidité relative contrôlée de 16,3% et au-dessus, et de 17,3 % et plus pour le blé (MAFF, 1997).

1-3.1.2. pH

La production d'ochratoxine A se fait surtout sur des denrées modérément acides. En effet, le pH optimum de production d'ochratoxine A se situe vers 5,6 pour *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*. Lai *et coll.* (1970) donne un pH optimum de 6,0 – 6,3 pour la production d'ochratoxine A par *Aspergillus sulphureus* (Fresenius) Thom et Church.

1-3.1.3. Les nutriments

La présence des micronutriments cités ci-dessous influence plus la production de l'ochratoxine A plutôt que la croissance du mycélium (Lia *et coll.*, 1970).

Les différents sucres sont une source très importante de carbone. La production d'OTA est maximale avec le glucose et le saccharose, mais décroît avec le mannose, le galactose, le xylose, le maltose et l'arabinose. La croissance du mycélium, liée avec la production d'ochratoxine A, est nulle en présence de lactose (Lia *et coll.*, 1970).

Une meilleure production de mycotoxine est observée lors d'un apport en soufre sous forme de SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, méthionine ou cystéine plutôt que sous forme de S^{2-} ou S_2O^{2-} . L'apport de magnésium (MgSO_4) est suffisant à une concentration de 300 mg/l (Lia *et coll.*, 1970).

L'apport de 100 mg/l de potassium (KCl) et de 25 mg/l de phosphore (KH_2PO_4) induit une production maximum d'ochratoxine A alors que le tiers de cette concentration suffit pour une bonne croissance mycélienne. Certains éléments comme le fer, zinc, cuivre, molybdène et bore sont nécessaires pour la production du mycélium et de cette mycotoxine chez *Aspergillus ochraceus* et *melleus* Yukawa alors qu'ils ne le sont pas avec *A. sulphureus* (Steele *et coll.*, 1973 ; Aziz et Moussa, 1997).

Des agents antimicrobiens utilisés contre *A. sulphureus* et *P. viridicatum* inhibent totalement la production d'OTA. Il s'agit du sorbate de potassium, du méthylparabène et du propionate de sodium (Tong et Draughon, 1985).

1-4. Absorption, distribution, métabolisme et élimination de l'OTA.

L'ochratoxine A est considérée comme un acide faible, $pK_a = 7,1$ (Pitout, 1968 ; Galtier *et coll.*, 1977). Elle est absorbée sous forme non ionisée au niveau du jéjunum proximal (Kumagai, 1988). La distribution de l'OTA se fait par voie sanguine où elle est liée à plus de 99 % aux protéines plasmatiques (seulement 78% chez les poissons) (Hagelberg *et coll.*, 1989). La distribution tissulaire de l'OTA est généralisée mais se retrouve en plus forte concentration dans certains organes cibles : reins (47%), foie (27%), autres (26%) (Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro, 1999b). Il a été démontré chez divers mammifères (rats et lapins) et chez l'être humain que cette mycotoxine passait facilement dans le lait maternel (Galtier *et coll.*, 1977 ; Ribelin *et coll.*, 1978 ; Skaug *et coll.*, 2001). Par contre, chez les ruminants où la microflore du rumen métabolise l'OTA grâce à la carboxypeptidase A (Stoev *et coll.*, 2002), la mycotoxine se retrouve de ce fait en très faible quantité dans le lait.

L'OTA est principalement métabolisée en ochratoxine α mais aussi sous des formes hydroxylées (4-hydroxy-OTA et 10-hydroxy-OTA) qui ne présentent, ainsi que les autres métabolites, qu'une faible activité toxicologique (Stormer *et coll.*, 1983 ; Omar *et coll.*, 1996 ; Xiao *et coll.*, 1996 ; Gross-Steinmeyer *et coll.*, 2002).

Son élimination se fait par les urines (>50%) et les fèces selon la capacité du cycle entérohépatique et sa fixation aux protéines plasmatiques (Kuiper-Goodman et Scott, 1989).

La demi-vie d'élimination varie donc en fonction de ces facteurs : 24 à 39 heures chez la souris, 55 à 120 heures chez le rat, 72 à 120 heures chez le cochon, 510 heures chez le macaque et 840 heures soit 35 jours chez l'homme (Petzinger et Ziegler, 2000).

CHAPITRE 2

TOXICITÉ DE L'OCHRATOXINE A

Le statut toxicologique de l'ochratoxine A a été examinée de nombreuses fois et a fait l'objet d'une monographie complète par le CIRC en 1993 (IARC, 1993). Sa toxicité reste très variable et dépend du sexe, de l'espèce et du type cellulaire (O'Brien *et coll.*, 2001). La souris reste moins sensible que le rat à l'action de l'OTA et le rat mâle plus sensible que la femelle. Par contre, le porc reste extrêmement sensible à l'OTA ce qui pose des problèmes agricoles et de santé publique (Walker, 1999). Connue depuis longtemps comme néphrotoxique, cancérigène, immunotoxique et tératogène, les trois principaux mécanismes de toxicité de l'OTA sont une inhibition de la respiration mitochondriale provoquant une déplétion d'ATP, une inhibition de ARNt-synthétase entraînant une baisse de la synthèses des protéines et une action des peroxydases lipidiques entraînant une augmentation des radicaux libres (Hölher, 1998)

L'ochratoxine A est actuellement l'objet de toutes les recherches portant sur le mode d'action de sa génotoxicité ; action directe, indirecte, mécanisme oxydatif, métabolite(s) mutagène(s), c'est ce que doivent éclaircir les recherches futures. Voyons les points essentiels de la toxicité de l'ochratoxine A.

2-1. Néphrotoxicité de l'ochratoxine A

L'ochratoxine A est potentiellement néphrotoxique chez tous les mammifères non ruminants (Ribelin *et col.*, 1978). Des épidémies de néphropathies porcines touchant régulièrement les pays scandinaves, en particulier le Danemark et la Suède mais aussi les autres pays européens, furent corrélées avec une exposition à l'ochratoxine A (Krogh, 1976a). D'autres animaux en particulier les poulets présentent les mêmes signes caractéristiques de cette néphropathie (Biro *et coll.*, 2002).

Cette toxicité s'exerce principalement par cytotoxicité et cancérogénicité au niveau des cellules du tube contourné proximal du néphron. Son action se caractérise par une protéinurie, une

enzymurie, une baisse de l'osmolarité urinaire, une fonction tubulaire altérée et des changements histopathologiques tels une fibrose corticale interstitielle, des lésions tubulaires proximales (réduction de la bordure en brosse, atrophie tubulaire, pycnose) (Delacruz et Bach, 1990).

Les figures 4 et 5 nous montrent les changements histopathologiques du glomérule et du tubule après administration d'ochratoxine A pendant 28 jours .



Figure 4: Rein de porc exposé à 1 ppm de OTA. Cordon de tissus fibreux entourant le pôle urinaire du glomérule normal et du tube proximal dilaté, avec la bordure en brosse réduite. H - E x 360 (reproduit de Krogh *et coll.*, 1974).



Figure 5: Rein de porc exposé à 4 ppm de OTA. Glomérule sclérosé, localisé dans le tissu interstitiel fibreux. H - E x 360 (reproduit de Krogh *et coll.*, 1974).

L'ochratoxine A est excrétée par les transporteurs anioniques organiques de la membrane basolatérale du tube proximal puis réabsorbée par tous les segments du néphron ce qui augmente sa demi-vie d'élimination et *a fortiori* sa toxicité (Zingerle *et coll.*, 1997 ; Sauvante *et coll.*, 1998 ; Dahlmann *et coll.*, 1998). L'OTA entre en compétition avec les transporteurs des anions organiques des cellules du tube contourné proximal tels le succinate, le sulfate et le para-aminohippurate (Sokol *et coll.*, 1988). Ce phénomène est saturable et inhibé par des anions organiques comme le probénécide, l'octanoate, l' α -cetoglutarate (Groves *et coll.*, 1999). Par contre, il semblerait ne pas y avoir de compétition avec les mécanismes de transport des acides

aminés et en particulier celui de la phénylalanine (Gekle and Silbernagl, 1994 ; Zingerle *et coll.*, 1997).

Les lésions observées sur le terrain chez des animaux présentant des néphropathies ont été reproduites par l'administration de régimes alimentaires additionnés d'OTA à des taux identiques à ceux qui avaient été relevés dans les denrées contaminées naturellement. Ainsi, la totalité des 29 porcs ayant reçu des rations alimentaires contenant des taux d'OTA de 0,2 à 4 mg/kg, ont développé une néphropathie après 4 mois d'exposition (Krogh *et coll.*, 1974). Dans d'autres expériences de contamination chronique chez les porcs, on observe à 0,2 ppm d'OTA, des néphropathies quelques mois après l'administration. Pour des taux de 1 à 1,4 ppm de toxine, il se produit une décoloration des reins (de violet à incolore au microscope) et une nécrose en 2 semaines (Elling, 1979). Chez les poulets, une exposition de 0,125 mg d'OTA, 4 fois par semaine pendant 4 semaines, provoque une glomérulonéphrose, une tubulonéphrose, une prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium des tubules et des structures ressemblant à un adénome au niveau du parenchyme rénal (Biro *et coll.*, 2002). Chez l'homme, l'OTA est fortement suspectée comme agent étiologique de la néphropathie endémique des Balkans (Krogh, 1972 ; Petkova-Bocharova et Castegnaro, 1991).

2-2. Immunotoxicité de l'ochratoxine A

L'ochratoxine inhibe la prolifération des lymphocytes périphériques T et B et stoppe la production d'interleukine 2 (IL2) ainsi que ses récepteurs (Lea *et coll.*, 1989). L'IL2 est une cytokine responsable de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T, d'interféron, de TNF et d'Interleukine 6 (IL6) responsable, quant à elle, de l'activation de protéine C réactive (CRP) et de maturation des lymphocytes B. Administrée à divers animaux, l'OTA provoque des effets variables au niveau de la réponse immunitaire. Des doses de 2,5 mg/kg de masse corporelle

d'OTA de nourriture administrées à des porcs entraînent une diminution de l'activité phagocytaire des macrophages et de la production d'IL2 (Hult *et coll.*, 1980 ;1984).

On observe également une diminution de la taille du thymus, une baisse de l'activité phagocytaire et une inhibition de la croissance tumorale chez les souris Swiss pour des doses d'OTA de 20 à 80 mg/kg en intrapéritonéale, un jour sur deux pendant huit jours (Boorman *et coll.*, 1984). Chez le cobaye, on note une nécrose et des œdèmes des ganglions lymphatiques, de la rate et du thymus ainsi qu'une leucopénie à des doses de 5,6 mg/kg de masse corporelle (Hagelberg *et coll.*, 1989).

Sur le plan industriel, cette immunité déficiente peut entraîner une baisse de la résistance aux agents infectieux et à la réponse vaccinale chez les porcs. Il s'ensuit une baisse de productivité porcine et une augmentation de l'utilisation d'agents anti-infectieux (Oswald et Comera, 1998).

2-3. Tératogénicité de l'ochratoxine A

Une injection d'OTA intrapéritonéale de 5 mg/kg chez la souris gestante provoque entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour une diminution du poids fœtal, une mort *in utero* dans quelques cas et une augmentation des malformations telles qu'exencéphalie, anomalies oculaires, faciales, digitales et caudales. Les malformations les plus importantes sont survenues lors de l'administration d'OTA le 8^{ème} jour de gestation (Hayes *et coll.*, 1974 ; Wei et Sulik, 1993).

Chez le rat, des administrations répétées d'OTA de 0,75 mg/kg de masse corporelle, du 6^{ème} au 15^{ème} jour sont embryotoxiques et tératogènes. Elles induisent des anomalies du squelette et des viscères (Brown *et coll.*, 1976). La dose tératogène minimale est de 1,75 mg/kg ; elle est plus toxique lorsqu'elle est administrée au 5^{ème} ou 6^{ème} jour de la gestation (Mayura *et coll.*, 1982).

Chez les embryons de poulet, des malformations touchant les membres, le cou, les viscères et la taille ont été notées après l'injection dans la poche d'air d'œufs fertilisés, d'une dose de 5 µg d'OTA par œuf (Gilani *et coll.*, 1978). Le mécanisme d'action de l'OTA n'a pas été clairement élucidé. Elle traverse le placenta, s'accumule dans les tissus fœtaux (Ballinger *et coll.*, 1976) et

altère un certain nombre de paramètres associés à la croissance et la différenciation cellulaire embryonnaire chez le rat, dépendante de la dose (Mayura *et coll.*, 1986). La gravité des malformations dépend de la voie d'administration et de la période gestative.

2-4. Génotoxicité de l'ochratoxine A

Pendant longtemps, les tests de mutagenicité sur l'OTA n'ont donné que des résultats négatifs ou peu concluants ; certains tests à court terme n'ont pas révélé d'activité mutagène de l'OTA (Ames, et les tests de synthèse non-programmés d'ADN (UDS), d'échanges de chromatides sœurs (SCE) et d'aberrations chromosomiques dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) ont été négatifs ou équivoques (Dirheimer, 1998). Une mutation génétique a été observée sur des lignées cellulaires de NIH/3T3 transfecté par de l'ADNc codant pour les cytochromes P450 (De Groene *et coll.*, 1996).

Dernièrement, un test comète réalisé sur des cellules de rein de chien Madin-Darby (MDCK) en présence d'OTA a montré d'une part la confirmation de la génotoxicité de l'OTA et d'autre part l'importance du système de réparation de l'ADN (Lebrun et Follmann, 2002). Les études de génotoxicité significatives sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 4).

Conclusion des études	Résultats	Références
Tests d'Ames sur <i>Salmonella typhimurium</i> (mutations géniques) Test de Kada sur <i>Bacillus subtilis</i> (génotoxicité), SOS chromotest sur <i>Escherichia coli</i> (génotoxicité), Test sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3 (mutations géniques). Conclusion : OTA ne présente pas pas d'activité mutagène ou génotoxique aux doses étudiées (de 25.10 ⁻⁴ à 1.000 µg/ml).	1 test positif sur 10	Kuczuk <i>et coll.</i> , 1978; Ueno et Kubota, 1976; Wehner <i>et coll.</i> , 1978; Bendele <i>et coll.</i> , 1985, Krivobok <i>et coll.</i> , 1987.
Test de mutation génique sur cellules de mammifères <i>in vitro</i> (5 et 10 µg/ml d'OTA)	-	Umeda <i>et coll.</i> , 1977
Cassures simple brin d'ADN (Test SCE : Echange de chromatides soeurs) dans des cellules de rate de souris (<i>in vitro</i>) et dans des cellules de reins, foie et rate (<i>in vivo</i>) après injection intrapéritonéale chez la souris.	+	Creppy <i>et coll.</i> , 1985; Kane <i>et coll.</i> , 1986.
Formation de plusieurs adduits d'ADN après administration orale de 0,6 à 1,2 mg/kg mc d'OTA chez la souris.	+/-	Pfohl-Leszkowicz <i>et coll.</i> , 1991; 1993.
SCE et cassure d'ADN dans les organes cibles (cellules épithéliales de vessie urinaire porcine et cellules humaines d'urètre) pour une concentration d'OTA allant de 250 à 1.000 nM.	++	Föllmann <i>et coll.</i> , 1995; Dörrenhaus <i>et coll.</i> , 1997.
Substitution de paires de bases après activation métabolique par microsomes de reins en présence d'acide arachidonique et de NADPH comme cofacteurs.	++	Obrecht- Pflumio <i>et coll.</i> , 1999.
Formation d'adduits d'ADN plus fréquente avec des microsomes de reins et acide arachidonique qu'en présence de microsomes de foie et NADPH. Formation d'adduits de dGMP tendant à prouver l'interaction de l'OTA avec des résidus guanine de l'ADN. Conclusion : formation de dérivés oxydés et génotoxiques.	++	Obrecht- Pflumio <i>et coll.</i> , 2000.
Pas de formation de dérivés génotoxiques par des enzymes humaines ou de rate.	-	Gautier <i>et coll.</i> , 2001.
Pas ou peu de biotransformation oxydative par des microsomes hépatiques ou rénaux.	-	Zepnik <i>et coll.</i> , 2001.
Conclusion : l'OTA ne présenterait pas de génotoxicité par formation préalable de métabolites oxydatifs.		
Formation d'adduits d'ADN et de dGMP en présence d'OTA et de peroxydase de raifort à hautes doses.	++	Obrecht- Pflumio <i>et coll.</i> , 2001.

Tableau 4: Chronologie des études de génotoxicité de l'OTA. (d'après Petzinger *et coll.*, 2000).

Les adduits d'ADN réalisés par l'OTA ont été démontrés dans de nombreuses études de génotoxicité (Pfohl-Leszkowicz *et coll.*, 1991 ; Pfohl-Leszkowicz *et coll.*, 1993 ; Petkova-Bocharova *et coll.*, 1998 ; Obrecht-Pflumio & Dirheimer, 2000 ; Obrecht-Pflumio & Dirheimer, 2001). Ils sont essentiels au sein de la première étape de cancérisation (initiation) par un xénobiotique chimique. La plupart des adduits ainsi formés disparaissent quelques jours après la fin du traitement par l'ochratoxine A (Wang et Groopman, 1999).

Dès la fin des années 1990, un tournant est abordé dans la compréhension de la génotoxicité de l'OTA. L'activation de cette mycotoxine se ferait sous l'action des peroxydases des prostaglandines synthétases et/ou des lipoxygénases, conduisant à la formation d'un métabolite directement génotoxique mais non identifié : telle est l'hypothèse retenue par Obrecht-Pflumio et Dirheimer (2001). Les trois études de génotoxicité publiées récemment (Gautier *et coll.*, 2001; Zepnik *et coll.*, 2001 ; Gross-Steinmeyer *et coll.*, 2002) et utilisant des cellules hépatiques humaines ou de rat en présence de ³H-OTA ne permettent pas de confirmer ces résultats; les conclusions de ces études s'orientent vers une autre voie : l'OTA par son activité cytotoxique conduirait à des lésions de l'ADN. Divers travaux avaient déjà observé des interactions de l'OTA avec des signaux extra et intracellulaires impliqués dans la mitose (tels les protéines kinases : MAPKs ("Mitogen-Activated Protein Kinases"); les protéines kinases activées par le stress : JNK ("c-Jun N-terminal kinases")) à des concentrations nanomolaires d'OTA dans des cellules épithéliales tubulaires rénales (Gekle *et coll.*, 1994; Schramek *et coll.*, 1997; Gekle *et coll.*, 2000). Gekle et ses collaborateurs (2000) supposent que ces interactions pourraient expliquer certains des effets néphrotoxiques et tératogènes observés lors d'exposition à long terme de faibles doses d'OTA. Cette activité épigénétique est également soulignée dans les récents travaux de Horvath et ses collaborateurs (2002). Néanmoins, les études doivent se poursuivre pour connaître précisément le mode d'action de l'OTA relié à sa génotoxicité.

2-5. Potentialisation de la toxicité de l'ochratoxine A par la citrinine

La citrinine, analogue structural de l'OTA, est produite par plus de 26 espèces de micromycètes essentiellement des genres *Aspergilli* et *Penicillium* (Dirheimer, 1998). Classée par le CIRC dans le groupe 3 défini « Inclassables quant à leur cancérogénicité pour l'homme » la citrinine suit conjointement la production d'OTA (Harwig et Chen, 1974 ; Lopez-Garcia et Park, 1999 ; Vrabcheva *et coll.*, 2000). et potentialise l'effet néphrotoxique, hépatotoxique et cancérogène de l'ochratoxine A (Betina, 1989b).

2-6. La néphropathie endémique des Balkans

La néphropathie endémique des Balkans (NEB) est une maladie rénale bilatérale chronique. Sa prévalence étant maximale dans divers pays d'Europe centrale, le long du fleuve Danube et d'un de ses affluents, la Save: Serbie, Bosnie, Croatie, Bulgarie et Roumanie (Stefanovic, 1998 ; Bukvic *et coll.*, 2000).

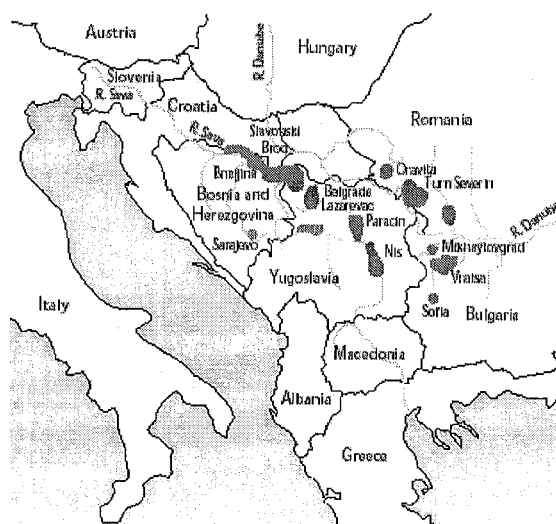


Figure 6 : Répartition des zones de néphropathie endémique dans la région des Balkans (d'après Stefanovic et Polenakovic, 1991).

La maladie est asymptomatique à ses débuts mais progresse lentement. Elle se caractérise histologiquement par une dégénérescence tubulaire, une fibrose interstitielle et une hyalinisation des glomérules. Le rein est considérablement réduit en taille et peut peser moins de 50 g (150 à 300 g à l'état normal) (WHO, 1979 ; Stefanovic, 1998).

Dans cette maladie, on retrouve (WHO, 1979 ; Stefanovic, 1998 ; Peraica *et coll.*, 1999 ; Pfohl-Leskowicz et Castegnaro, 1999b ; Puntaric *et coll.*, 2001) :

- une hypertension normale mais croissante,
- une faible et intermittente protéinurie (< 1g/l),
- la présence de β_2 -microglobuline à un stade avancé de la maladie,
- une anémie de type normochrome,
- une augmentation graduelle de l'azote sanguin,
- aucun œdème, ni rétention sodée,
- Un ictère ainsi qu'une xanthochromie de la paume de la main.

L'étiologie de la NEB est controversée mais la similitude des signes cliniques et histopathologiques de celle-ci avec la néphropathie porcine a dirigé les recherches vers une possible implication de l'ochratoxine A (Krogh, 1972 ; Tapia et Seawright, 1984 ; Stoev *et coll.*, 2001). Néanmoins, la communauté scientifique s'oriente vers quatre grandes étiologies possibles :

- une infection virale : un coronavirus a été isolé de biopsie de reins chez des patients atteints de NEB (Uzelac-Keserovic *et coll.*, 1999) ;

- une prédisposition génétique : un marqueur spécifique de la néphropathie endémique des Balkans a été trouvé sur le chromosome 3q (Stefanovic, 1998) et suppose une prédisposition de certaines personnes à cette maladie ;

- la contamination de l'eau potable par des lignites : des dépôts de lignites du Pliocène retrouvés dans les régions endémiques contribuent à l'apport régulier de composés aromatiques polycycliques toxiques dans l'eau de boisson (Stefanovic, 1998 ; Puntaric *et coll.*, 2001) ;

- et une ingestion de denrées contaminées par l'ochratoxine A et d'autres mycotoxines agissant en synergie (Vrabcheva *et coll.*, 2000).

Les faits en faveur d'une corrélation entre l'OTA et la NEB sont nombreux :

- une teneur en OTA supérieure dans les aliments des régions endémiques (Stefanovic, 1998) ;

- une répartition géographique de l'OTA dans le maïs et le blé superposable aux régions endémiques (Puntaric *et coll.*, 2001) ;

- la ressemblance des symptômes de la néphropathie porcine avec la NEB (Krogh, 1972 ; Stephanovic, 1998 ; Özçelik, 2001) ;

- des variations saisonnières des concentrations sanguines de l'OTA, de la protéinurie et de l'incidence et prévalence de la maladie (Austwick, 1975 ; Peraica *et coll.*, 2001) ;

- la découverte de néphropathie ressemblant à la NEB en Tunisie et Turquie et sa corrélation avec un fort taux sérique d'OTA (Maaroufi *et coll.*, 1995 ; Özçelik *et coll.*, 2001).

La compréhension de l'étiologie et de la pathogenèse de la NEB se fait à petits pas. Les malades dont l'incidence décroît depuis deux décennies (période 1970/79 : 2,75 cas / 10.000 ; 1995/97 : 0,96 cas / 10.000 personnes) (Puntaric *et coll.* 2001) sont traités par hémodialyse ou greffe de reins mais l'association de tumeur du tractus urinaire compromet leurs chances de survie (Stefanovic, 1998).

CHAPITRE 3

SOURCES ET PRÉSENCE DE L'OCHRATOXINE A

Depuis sa découverte en 1965 (Van der Merwe *et coll.*, 1965), la liste des denrées contaminées par l'ochratoxine A continue de s'allonger pour les céréales et les produits dérivés, les fèves, l'orge, le malt, les aliments pour animaux, des aliments aussi disparates que les saucisses, le café, les figues, les abricots, les prunes, les noix de coco et même du poisson séché moisi en Egypte et Sierra Leone (Bhat et Vasanthi, 1999). Cette liste non exhaustive reflète l'hétérogénéité des contaminations éventuelles ainsi que leur distribution dans le monde entier. Voyons d'abord les souches fongiques impliquées, les contaminants éventuels ainsi que leur impact en bout de chaîne alimentaire.

3-1. Souches fongiques productrices d'ochratoxine A

L'ochratoxine A fut isolée la première fois en 1965, de souches d'*Aspergillus alutaceus* (anciennement nommé *Aspergillus ochraceus*). Depuis, on n'a cessé de découvrir des souches fongiques capables de synthétiser cette mycotoxine chez diverses espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* ou autres. De plus, avec le développement récent des méthodes d'analyses telles les méthodes immunochimiques, la chromatographie liquide haute performance (CLHP), on peut détecter et doser d'une manière fiable la production fongique d'OTA, même à de très faibles concentrations (de l'ordre de 0,5 ppb). Voyons les diverses souches fongiques ochratoxinogènes.

3-1.1. Genre *Aspergillus*

Aspergillus alutaceus fut la première espèce ochratoxinogène découverte (Scott, 1965 ; Van der Merwe *et coll.*, 1965). Au cours des années suivantes, six autres furent isolées appartenant à la section *Circumdati* : *A. alliaceus* Thom et Church, *A. melleus* Yukawa, *A. sulphureus* (Fresenius) Thom et Church., *A. ostianus* Wehmer, *A. petrakii* Voros et *A. sclerotiorum* Huber (Betina, 1989c). Un micromycète de la section *Aspergillus*, *Eurotium herbariorum* (Wiggers) Link, est

aussi capable de produire cette mycotoxine (Abarca *et coll.*, 1994). Les auteurs de cette étude mirent en évidence pour la première fois, deux souches d'*Aspergillus niger* var. *niger*, la souche A-75 identifiée comme étant : *A. niger* var. *tubingensis* Schober, et la souche A-136 correspondant à *A. niger* var. *ficcum* (Reichardt) P. Hennings (Tableau 5).

Provenance :	Aliment pour poulet	Germe de soja
	<i>A. niger</i> var. <i>tubingensis</i>	<i>A. niger</i> var. <i>ficcum</i>
	Souche A-75 (ATCC ¹)	Souche A-136 (ATCC)
Production d'OTA sur YES ²	0,23 µg/ml	0,59 µg/ml
Production d'OTA sur maïs mouillé	0,21 µg/g	0,36 µg/g

Tableau 5: Quantité d'OTA produite pour chaque souche d'*Aspergillus niger* var. *niger* (¹ATCC : Codification de la collection de culture de type américain ; ²YES : milieu extrait de levure – saccharose).

En 1996, Teren et ses collaborateurs, ont testé 157 souches d'*Aspergilli* section *Nigri* par des méthodes immunochimiques confirmées par CLHP et chromatographie sur couche mince (CCM). Les résultats furent très satisfaisants car ils détectèrent une production d'OTA dans 5 des 12 souches d'*Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom ainsi que dans *A. foetidus* Thom & Raper, *A. awamori* Nakazawa et *A. niger* van Tieghem.

Dans la continuité de ces travaux, Varga et ses collaborateurs (1996) ont testé 172 souches représentatives des sections *Fumigati*, *Circumdati*, *Candidi* et *Wentii* du genre *Aspergillus*. Les nouvelles méthodes ELISA et de quantification par CLHP ont permis de conclure à une production d'OTA par plusieurs espèces dont trois nouvelles souches ochratoxinogènes : *A. albertensis* Tewari, *A. auricomus* (Gueguen) Saito et *A. wentii* Wehmer. Ces souches produisaient respectivement 250, 5-7 et 0,05-0,1 µg/ml d'ochratoxine A.

Plus récemment, Accensi et ses collaborateurs (2001) répartirent un ensemble de 92 souches *Aspergillus niger* en deux espèces morphologiquement distinctes par la méthode de la sonde

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* : polymorphisme de la longueur du fragment de restriction) de la région interne transcrite (ITS) de l'ADN ribosomal 5,8 S. 44 souches furent identifiées et placées dans le groupe *A. niger* (groupe N) et 48 dans le groupe *A. tubingensis* (groupe T). Seules six souches appartenant toutes au groupe N produisirent de l'OTA (Tableau 6).

Espèces et souches	Taux d'OTA produite (ng/ml)
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> A75	486,7
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> A75	1.124,3
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> A75	963
<i>A. foetidus</i> CBS 618.78	146,7
<i>A. awamori</i> NRRL 3112	30,9
<i>A. usarii</i> CBS 139.52	26,1

Tableau 6. Quantité d'OTA produite sur milieu YES (extrait de levure – saccharose) par des souches fongiques d'*Aspergillus niger* (Accensi et coll., 2001).

3-1.2. Genre *Penicillium*

En 1989, huit espèces du genre *Penicillium* étaient citées comme étant capables de produire de l'OTA (Betina, 1989c). Elles furent découvertes sur une période allant de 1969 à 1983.

En 1993, lors de la publication par le IARC d'une monographie sur l'ochratoxine A, seules trois espèces de *Penicillium* étaient reconnues capables de produire cette mycotoxine : *P. verrucosum* Dierckx, *P. aurantiogriseum* Dierckx et *P. commune* Thom. En quatre ans, le nombre de souches fongiques susceptibles de produire de l'OTA est passé de huit à trois, l'explication vient du fait d'une mauvaise identification des souches fongiques.

Depuis, peu de souches autres que *P. verrucosum* ont démontré leur capacité à produire de l'ochratoxine A dans des conditions de laboratoire. Ainsi lors d'une étude en 1995 sur près de 11 échantillons de végétaux (collectés dans le sud-ouest de la France), plus de 120 champignons et 10 levures furent identifiés (Krivobok et coll., 1995). Ceux-ci ont été isolés, mis en culture en

milieu YES pour la production d'OTA et son dosage par CLHP. Les résultats de cette étude sont donnés dans le tableau 7 pour le genre *Penicillium*.

Nom	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx	T*	T*	T*		T	T*	T	T*	T*	T	T*
	/3,3	/2,3	/3,5			/2,2		/0,8	/1,5		/1,7
<i>Penicillium canescens</i> Sopp			+								
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom			T								
<i>Penicillium crustosum</i> Thom		+	+				+				
<i>Penicillium glabrum</i> (Wehner) Wrethlin			+								
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp								+	+	+	+
<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx								+			
<i>Penicillium olivicolor</i> Pitt					+	+					
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll			+								
<i>Penicillium rugulosum</i> Thom			+								+
<i>Penicillium variable</i> Sopp		T	T	T				T	T		T
<i>Penicillium verrucosum</i> Peyronel			+								
<i>Penicillium waksmanii</i> Zaleski								+			

Tableau 7: Présence de *Penicillium* dans divers échantillons et leur production d'OTA (Tiré de Krivobok *et coll.*, 1995).

N° échantillons : Maïs (1,2,3,4,5,6), orge (7), tournesol (8), avoine (9), graine de soja (10), pois (11). T : souche potentiellement productrice d'OTA, T* : souche produisant de l'OTA et sa quantité ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

Ainsi on remarque, que seul *P. aurantiogriseum* a montré une capacité à produire de l'OTA en conditions de laboratoire mais à de faibles concentrations comprises entre 0,8 et 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Lors des dernières rencontres mixtes FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) et OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de février 2001 (FAO/OMS, 2001), on parle toujours d'une seule espèce de *Penicillium* (*P. verrucosum*), capable de produire de l'ochratoxine A en milieu naturel dans les régions tempérées. On remarque donc que dans ce domaine, la taxonomie des micromycètes est essentielle pour une bonne identification des moisissures productrices d'OTA. Plusieurs tentatives de classement des *Penicillium*, en fonction des métabolites secondaires produits, de la couleur, du taux de croissance ou du milieu d'isolement, sont en cours (Larsen *et coll.*, 2001).

3-2. Contamination des denrées d'origine végétale par l'ochratoxine A

L'importance de connaître les produits potentiellement contaminés et leurs taux de contamination est essentielle pour la santé publique car elles permettent aux instances gouvernementales d'en tenir compte lors de la fixation des taux limites d'OTA selon le principe ALARA (= le plus bas taux qu'il est raisonnablement possible d'atteindre) dans les denrées alimentaires afin de mieux protéger les populations vis-à-vis de la toxicité de cette mycotoxine.

3-2.1. Céréales et dérivés

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'OTA (ou mycotoxine de stockage) fut isolée pour la première fois de graines de sorgho (Scott, 1965 ; Van der Merwe *et coll.*, 1965). Par la suite, de nombreuses études ont été menées après qu'il a été établi que l'OTA était un contaminant naturel des céréales et d'autres graines (Shotwell *et coll.*, 1969 ; Yamazaki *et coll.*, 1970). Les résultats donnés dans toutes les études citées sont à prendre avec précaution. En effet, la production de céréales s'exprime en millions de tonnes et les lots achetés par les industries agro-alimentaires de transformation sont souvent de plusieurs dizaines de tonnes. Il est donc difficile d'estimer la contamination réelle d'un lot en mycotoxine(s). De plus, plusieurs paramètres entrent en jeu : l'hétérogénéité de la répartition des mycotoxines, la difficulté à mettre en œuvre des méthodes d'échantillonnage représentatives, les méthodes d'analyse et les laboratoires impliqués conduisent à des variabilités intrinsèques importantes. Quelques données récentes de la présence de l'OTA dans les céréales sont reproduites dans le tableau 8.

Produit	Pays (Année)	Nombre d'échantillons	Incidence (%)	Intervalle (µg/kg)	Références
Blé, orge	R-U (1995)	1.061	4	1-33	Pittet, 1998
Blé	Suisse (1996)	28	54	0,1-10,0	—
Avoine	Danemark (1996)	92	44	0,05-5,6	—
Seigle	Danemark (1996)	616	42	0,05-121	—
Blé	Danemark (1996)	520	32	0,05-51	—
Orge	Allemagne (1997)	39	31	0,1-2,7	—
Blé	USA (1999)	383	14,6	< 5	Trucksess <i>et coll.</i> , 1999
Orge	USA (1999)	103	10,6	< 5	—
Avoine, blé et orge	R-U (1999)	306	21	0-17	Scudamore <i>et coll.</i> , 1999
Maïs	Croatie (2001)	51	33,3	0,02-40	Puntaric <i>et coll.</i> , 2001
Blé	Croatie (2001)	92	75,8	0,02-160	—
Orge	Suède (2002)	40	52,5	3-934	Olsson <i>et coll.</i> , 2002

Tableau 8: Données récentes de la présence d'ochratoxine A dans les céréales.

3-2.2. Graines

Les graines ne sont hélas pas épargnées d'une contamination ochratoxinogène, plus particulièrement le café et le cacao mais également pour en citer d'autres, le riz, le soja, les haricots, les pois, les cacahuètes (Walker, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz et Castegnaro 1999b). Hélas peu de données officielles sur la contamination des graines commercialisées en France sont disponibles. Néanmoins, celles-ci montrent des taux de contamination en OTA assez élevés qui sont résumés dans le tableau 9.

Produit	Pays (Année)	Nombre d'échantillons	Incidence (%)	Taux d'OTA (µg/kg)	Références
Café vert	R-U (1996)	291	38	< 0,2 - 27,3	MAFF, 1997
Poudre de cacao	R-U (1997)	20	85	0,2 - 1,1	Pittet, 1998
Café vert et torréfié	USA (1999)	32	56	< 5	Trucksess <i>et coll.</i> , 1999
Café soluble	Divers (1999)	13	33	<2 - 6,4	DGCCRF, 1999
Café torréfié	Divers (1999)	34	0	< 2	—
Café vert	Divers (1999)	42	33	< 2 - 65	—
Café vert	Divers (2000)	162	65	0 - 48	Romani <i>et coll.</i> , 2000
Café torréfié	Brésil (2000)	50	46	< 0,3 - 6,5	Leoni <i>et coll.</i> , 2000
Café vert	Divers (2001)	22	18	27 - 168	Sibanda <i>et coll.</i> , 2001
Café vert	Brésil (2001)	155	99,6	< 8	Urbano <i>et coll.</i> , 2001
Café vert	Divers (2002)	36	36	< 10 - >> 10*	Pittet et Royer 2002

Tableau 9: Données récentes de la présence d'ochratoxine A dans le café ou le cacao (*Dosage par CCM).

3-2.3. Raisins et dérivés.

Des enjeux économiques importants se jouent dans les pays producteurs de raisin depuis qu'ont été retrouvées des quantités non négligeables d'OTA en bout de chaîne alimentaire, que ce soit dans les raisins (frais ou séchés), jus de raisin ou vin.

En 1996, une première étude du service fédéral de santé publique suisse portant sur 118 échantillons de vin rouge, blanc et rosé, 15 échantillons de vins spéciaux (Malaga, Porto, Marsala, Sherry, Vermouth), 11 jus de raisin et 14 jus de fruits, a montré un taux de contamination assez

élevé (Zimmerli et Dick,1996). Depuis, quelques études scientifiques ont confirmé l'existence d'OTA dans les raisins et dérivés; elles sont résumées dans le tableau 10.

Produit	Nombre d'échantillons	Taux d'OTA (ng/L)	Moyenne (ng/L)	Références
Vin rouge	79	< 3 - 292	39	Zimmerli <i>et coll.</i> , 1996
Vin rosé	15	< 3 - 55	25	—
Vin blanc	24	< 3 - 13	11	—
Jus de raisin rouge	8	< 3 - 311	188	—
Jus de raisin blanc	3	< 5	nc*	—
Vin rouge	50	0,01 – 0,8 µg/kg	nc	MAFF, 1997
Jus de raisin	20	0,03 – 2,05 µg/kg	nc	—
Jus de raisin	54	< 100 – 5.000	nc	DGCCRF, 1999
Raisins secs, sultanine, corinthe.	60	< 0,2 – 53,6	nc	MacDonald <i>et coll.</i> , 1999
Vin du sud-ouest et vallée de la Loire	47	< 100	nc	DGCCRF, 2000
Vin rouge	96	< 1 – 3.177	419	Pietri <i>et coll.</i> , 2001
Vin de dessert	15	< 1 – 3.856	8	—
Vin rouge	31	10 – 3.400	nc	Markaki <i>et coll.</i> , 2001
Vinaigre balsamique	15	8 – 252	nc	—
Vin	30	28 – 3.240	650	Filali <i>et coll.</i> , 2001
Raisins et mous	11	< 10 – 461	nc	Sage <i>et coll.</i> , 2002

Tableau 10: Concentration d'OTA dans les dérivés de raisins dans diverses études depuis 1996 (* nc = non calculé).

La présence d'OTA dépend de nombreux facteurs (Otteneder et Majeres 2000; Pietri *et coll.*, 2001) : le climat, le cépage des raisins, la situation géographique du vignoble, l'équipement des sites de première transformation et l'utilisation de certain traitement de moûts (la filtration permettant de diminuer significativement la contamination).

Les taux d'OTA les plus élevés sont principalement rencontrés dans les échantillons provenant des pays du sud (Tunisie, Maroc, Italie du Sud). Les vins blancs sont moins touchés par la contamination car les raisins blancs sont pressés directement, tandis que les raisins rouges sont laissés au repos pendant un certain temps, en moyenne une à deux semaines (Höhler, 1998).

3-2.4. Autres aliments

Lait et dérivés

Peu de données existent concernant la contamination réelle en OTA des laits de vache et dérivés. Une étude norvégienne montre que le taux d'OTA retrouvé dans 11 des 107 échantillons, est inférieur à 58 ng/l et ne dépasse pas la dose tolérable journalière estimée à 5 ng/kg de poids corporel par jour (Skaug, 1999).

Herbes et épices

Les herbes et épices sont très nombreuses et les données scientifiques peu exhaustives. On retrouve dans diverses études allant de 1996 à 2001 : paprika, chili, poivre de Cayenne, poivre noir, blanc et vert, coriandre, origan, moutarde, gingembre, qui contiennent de l'OTA à des taux non négligeables, mais leur faible consommation n'aurait pas ou peu d'effet sur la santé humaine (Tableau 11).

Pays	Année	Nombre d'échantillons	Incidence (%)	Taux d'OTA (µg/kg)	Références
R-U	1996	29	86	1,2 - 50,4	Pittet, 1998
Allemagne	1998	204	63	0,05 - 16,43	Vrabcheva <i>et coll.</i> , 1998
Égypte	1998	84	3	20 - 80	Aziz <i>et coll.</i> , 1998
Inde	2001	126	36	10 - 102	Thirumala-Devi <i>et coll.</i> , 2001

Tableau 11: Taux d'OTA dans les herbes et épices.

Bière

La bière est produite à partir de moût de céréales comme l'orge ou le maïs. La contamination de ces bières par l'OTA provient de la contamination des matières premières, le tableau 12 récapitulant les analyses réalisées au cours de ces dernières années.

Pays	Nombre d'échantillons	Incidence (%)	Taux d'OTA (µg/l)	Références
France	73	12	< 0,02 - 0,2 µg/kg	DGCCRF, 1999
France (moûts de bière)	14	64	< 0,02 - 0,2 µg/kg	-
Italie	61	50	< 0,01 - 0,135	Visconti <i>et coll.</i> , 2000
Maroc	5	0	nd*	Filali, 2001
Afrique du sud	6	2	3 - 2.340	Odhav <i>et coll.</i> , 2002

Tableau 12: Taux d'OTA dans quelques bières du monde (* nd = non décelable).

3-3. Contamination des denrées d'origine animale par l'ochratoxine A

L'OTA, bien que contaminant direct de végétaux tels que les céréales, se retrouve dans la viande et dérivés ainsi que dans les produits laitiers. C'est un mode de contamination indirecte qui passe par l'administration d'aliments contaminés (principalement des céréales moisies) aux animaux (Kuiper-Goodmann et Scott, 1989). Plusieurs pays ont mis en place des programmes de

surveillance et particulièrement la France, celle-ci étant un grand producteur de porcs (Direction de la santé, 1999 ; Dragacci *et coll.*, 1999).

Pays	Produit	Nombre d'échantillons	Incidence (%)	Taux d'OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Références
Allemagne	Rein de porc	300	13,6	0,5 - 10	Scheuer et Leistner, 1986
Allemagne	Saucisse de porc	325	17,8	0,1 - 3,4	—
France	Rein de porc	400	10	0,4 - 1,4	Dragacci <i>et coll.</i> , 1999
France	Rein de porc	710	7,6	0,5 - 5	—
Suisse	Saucisse	12	0,8	0,8	Baumann et Zimmerli, 1988
Yougoslavie	Aliments fumés	206		0,01 - 9	Pepeljnjak <i>et coll.</i> , 1982
	Bacon		18,9	37 - 200	
	Jambon		28,9	40 - 70	
	Saucisse		12	10 - 920	

Tableau 13 : Exemple de contamination des denrées animales.

Il est rare de retrouver des traces d'ochratoxine A chez les ruminants car la mycotoxine est dégradée par la carboxypeptidase A dans le rumen (Stoev *et coll.*, 2002). Lorsque le porc, animal monogastrique, souffre de néphropathie, 25 à 39 % des cas ont un taux d'OTA compris entre 2 et 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Krogh, 1992). Après les néphropathies porcines danoises, les autorités ont mis en place une marche à suivre lors de changements macroscopiques de l'aspect des reins de porcs (Tableau 14).

Taux d'OTA (Tx) en $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les reins de porc à l'abattoir	Marche à suivre
Tx > 25	Destruction complète de la carcasse
10 < Tx < 25	Élimination des abats comestibles
Tx < 10	Élimination des reins uniquement

Tableau 14: Procédure à suivre lors de détection d'ochratoxine A chez le porc (d'après Dragacci *et coll.*, 1999).

3-4. Contamination humaine par l'ochratoxine A

3-4.1. Exposition de l'être humain à l'ochratoxine A

L'homme se contaminant exclusivement par son alimentation, il était logique de pratiquer des analyses sanguines, urinaires ou de lait maternel pour déterminer le taux moyen de contamination. Le tableau 15 récapitule ces analyses.

Pays	Type de prélèvement	Incidence	Taux d'OTA (ng/ml)	Références
Allemagne	Sérum	173 / 306	0,1 - 14,4	Bauer et Gareis, 1987
Allemagne	Lait maternel	4 / 36	0,017 - 0,03	Gareis <i>et coll.</i> , 1988
Bulgarie	Sérum	82 / 576	1 - 35	Petkova-Bocharova <i>et coll.</i> , 1991
Canada	Sérum	63 / 159	0,27 - 35,33	Frohlich <i>et coll.</i> , 1991
Croatie	Sérum	468 / 983	0,2 - 0,56 (moyenne)	Peraica <i>et coll.</i> , 2001
Danemark	Sérum	78 / 144	0,1 - 13,2	Hald, 1991
France (Alsace)	Sérum	97 / 500		Creppy <i>et coll.</i> , 1993
France (Aquitaine)	Sérum	385 / 2055		—
France (Rhône-Alpes)	Sérum	75 / 515		—
Italie	Lait maternel	9 / 50	1,7 - 6,6	Micco <i>et coll.</i> , 1991
	Lait maternel	22 / 111	0,1 - 12 µg/kg	Micco <i>et coll.</i> , 1995
	Sérum	134 / 138	0,12 - 2,84	Palli <i>et coll.</i> , 1999
Pologne	Sérum	9 / 216	1,3 - 4,8	Golinski <i>et coll.</i> , 1985
	Sérum	77 / 1.065	0,1 (Moyenne)	Golinski <i>et coll.</i> , 1991
Suède	Sérum	38 / 297	0,3 - 6,7	Breitholtz <i>et coll.</i> , 1991
Tunisie	Sérum	82 / 100	0,7 - 7,8	Maaroufi <i>et coll.</i> , 1995
Tunisie (insuffisants rénaux chroniques)	Sérum	100 / 100	12 - 55	—
Yougoslavie (Village avec NEB*)	Sérum	25 / 420	1 - 40	Hult <i>et coll.</i> , 1982
Yougoslavie (Village avec NEB)	Sérum	17 / 219	1 - 10	—
Yougoslavie	Sérum	240 / 17.175	5 - 100	Fuchs <i>et coll.</i> , 1991

Tableau 15: Incidence et taux de contamination chez l'homme (*NEB = Néphropathie endémique des Balkans).

Les concentrations moyennes de toutes ces études se situent entre 0,02 et 1,8 ng/ml (Höhler, 1998 ; Peraica *et coll.*, 1999). Les fluctuations du taux d'OTA dans le sérum humain est le reflet de la situation géographique, de la saison ou des variations annuelles de cette mycotoxine dans les aliments (Kuiper-Goodman et Scott, 1989 ; Peraica *et coll.*, 2001).

3-4.2. Estimation de l'ingestion d'ochratoxine A

L'estimation théorique de l'ingestion ne peut se faire qu'à partir des données disponibles des contaminations alimentaires en l'OTA, sachant qu'il existe aussi une importante variabilité du mode de consommation des populations des états européens et à l'intérieur même de chaque état. L'étude SCOOP (Scientific COOPeration, 1996) a permis de déterminer le taux moyen d'OTA ingérée en fonction des aliments les plus couramment contaminés en Europe (Commission Européenne, 1997). En moyenne, 2,3 ng/kg de masse corporelle seraient absorbés quotidiennement en Europe, les céréales représentant plus de la moitié des denrées contaminantes (Voir figure 7).

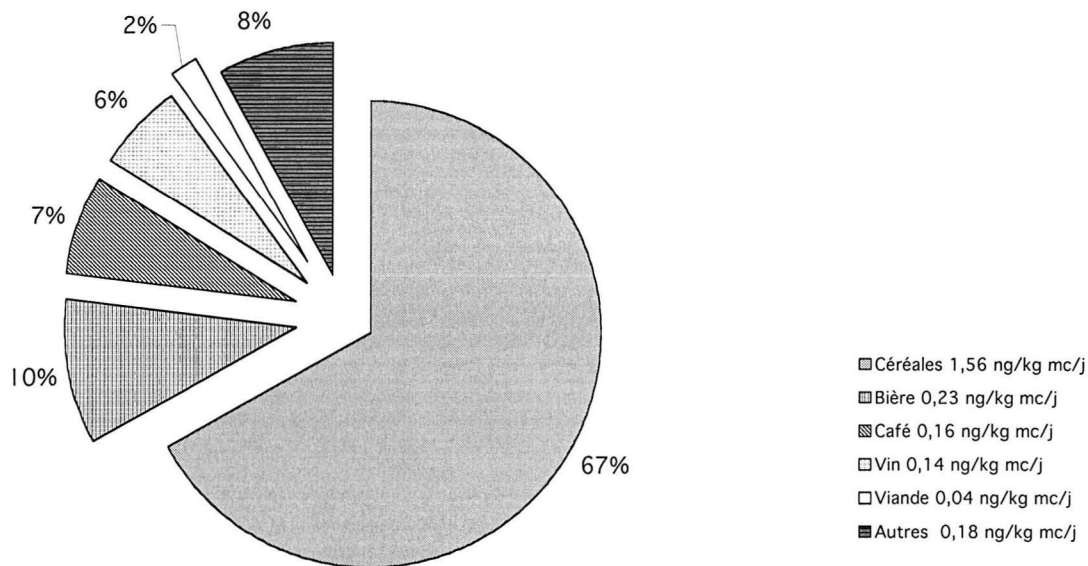


Figure 7: Proportion des différents aliments dans la consommation moyenne d'ochratoxine A (en ng/kg de masse corporelle (mc) et par jour) dans l'ensemble de la population européenne (Tiré de SCOOP, 1996 ; Commission européenne, 1997).

Néanmoins, ce n'est qu'une moyenne théorique et les proportions changent d'un pays à un autre. Chaque état doit être capable de connaître et de collecter les informations sur les habitudes alimentaires de sa population et de son exposition aux mycotoxines afin qu'elles puissent être traitées par les toxicologues (Verger *et coll.*, 1999). En 1991, Breitholtz et ses collaborateurs proposèrent une formule permettant de calculer la dose journalière (DJ) d'ingestion d'OTA : $DJ = C_p \times 1,34$ où C_p est la concentration plasmatique de l'OTA. Et c'est à partir de cette DJ que les états peuvent définir une dose journalière tolérable (DJT) ou une dose hebdomadaire tolérable (DHT), qui est plus appropriée du fait que l'ochratoxine A s'accumule dans le corps au fil du temps (Herman et Walker, 1999), en fixant un facteur de sécurité variable selon les études. Mais ce facteur reste arbitraire (Walker, 1999 ; FAO/OMS, 2001).

Le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA), lors de sa 37^{ème} rencontre en 1990, avait fixé une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de 112 ng/kg de masse corporelle puis celle-ci fut arrondie à 100 ng/kg mc en 1995, confirmée en 2001 lors de la 56^{ème} rencontre JECFA à Genève. Elle sera réévaluée en 2004 en fonction des connaissances acquises lors de cette période (FAO/OMS, 2001). Néanmoins, cette valeur représente la valeur haute de la fourchette et le comité scientifique de l'alimentation humaine (Commission européenne, 1998) a revu son avis sur l'OTA. Il souhaiterait réduire l'exposition à l'ochratoxine A car elle est potentiellement génotoxique (Petzinger et Ziegler, 2000) et l'on ne connaît pas son seuil d'effet cancérigène (Walker, 1999), en s'assurant que les ingestions soient proches de la zone inférieure de la fourchette des DJT : 1,2 à 14 ng/kg mc/ jour. Le groupe de travail nordique sur la toxicologie alimentaire et l'évaluation du risque a proposé une DTJ de 5 ng/kg mc/ jour (Com. Europ., 2000 ; Palli *et coll.*, 1999).

3-4.3. Détoxification

Les résultats de différentes études montrent qu'il est possible de détoxifier l'organisme contaminé par l'OTA mais les substances utilisées sont elles-mêmes toxiques et ne peuvent être utilisées à long terme chez l'homme ou l'animal (Baudrimont *et coll.*, 1994 ; 1995).

Ces substances potentiellement intéressantes sont les analogues structuraux de l'OTA (phénylalanine, aspartame), les produits ayant une forte affinité pour les protéines plasmatiques (aspirine, piroxicam) et les résines (Creppy *et coll.*, 1996).

L'administration simultanée de phénylalanine et d'ochratoxine A prévient l'inhibition par l'OTA de la synthèse des protéines par compétition avec celle-ci sur les sites de fixation de l'ARNt-synthétase (Creppy *et coll.*, 1984 ; 1998). L'aspartame hydrolysé en phénylalanine suit le même principe (Creppy *et coll.*, 1998).

L'aspirine et l'indométacine préviennent la génotoxicité de l'OTA par déplacement des liaisons sur les protéines plasmatiques et par conséquent, inhibition de son transport vers les organes cibles (Neal, 1998). Quant au piroxicam, il inhiberait, en plus de son action sur les protéines plasmatiques, l'oxydation de l'ochratoxine A par la voie des prostaglandines (Baudrimont *et coll.*, 1995).

La peroxydation lipidique de l'ochratoxine peut également être réduite par l'action de la superoxyde dismutase et de la catalase. L'action de ces deux enzymes précédant l'administration d'OTA permet une réduction des altérations rénales telles l'enzymurie, la protéinurie, la créatinurie et augmente l'excrétion rénale de la mycotoxine (Baudrimont *et coll.*, 1994)

La cholestyramine additionnée dans la nourriture animale permet de réduire les concentrations plasmatiques d'OTA ainsi que sa néphrotoxicité par réduction de la biodisponibilité (Madhyastha *et coll.*, 1992 ; Kerkadi *et coll.*, 1998).

CHAPITRE 4

LES DIFFÉRENTES MÉTHODES

D'ANALYSES

Avant toute méthode d'analyse, il convient d'échantillonner les lots à analyser selon des normes reconnues et validées par des organismes compétents afin qu'ils soient les plus représentatifs des lots à analyser. La directive européenne n° 98/53/CE du 16 juillet 1998 de la commission européenne (Comm. Europ., 1998a) établissait de manière officielle « les modes d'échantillonnage et les méthodes d'analyse pour le contrôle des aflatoxines » mais jusqu'à tout récemment elles n'existaient pas officiellement pour l'ochratoxine A. En mars 2002, est publiée au journal officiel des communautés européennes la directive n° 2002/26/CE du 16 mars 2002 établissant « les modes d'échantillonnages et méthodes d'analyse de l'ochratoxine A dans les denrées alimentaires » (Comm. Europ., 2002a) ; sont définis les critères d'échantillonnage, d'acceptation et de non-acceptation d'un lot compte tenu de la réglementation en vigueur (Annexe 1).

Les méthodes d'analyse validées sont celles qui ont été soumises à une évaluation interlaboratoire et dont les caractéristiques d'efficacité telles que la récupération, la répétitivité et la reproductibilité ont été déterminées. Cette validation demande du temps car il faut plusieurs mois pour organiser un essai et les organismes officiels (Centre Européen de Normalisation (CEN), AOAC International, ISO) qui examinent les méthodes proposées doivent appliquer des procédures prolongées.

Il existe deux normes ISO pour le dosage de l'OTA qui garantissent une « assurance qualité » dans la reproductibilité des essais.

=> ISO 15141-1 : Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés.

Partie 1 : Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par chromatographie sur gel de silice.

=> ISO 15141-2 : Dosage de l'ochratoxine A dans les céréales et produits dérivés.

Partie 2 : Méthode par chromatographie liquide haute performance comprenant une étape d'extraction par une solution de bicarbonate.

Nombre de ces méthodes remontent aux années 1970 et même si elles donnent des résultats fiables lorsqu'elles reposent sur la CCM, elles ne sont plus retenues aujourd'hui par les laboratoires du fait de limites de détection très insuffisantes ne permettant pas de répondre aux limites maximales imposées par les normes officielles (Gilbert, 1999).

4-1. Les méthodes immunochimiques

Ces méthodes peuvent être à la fois qualitatives, semi-quantitatives ou quantitatives selon la configuration du test.

Des anticorps spécifiques dirigés vers la mycotoxine recherchée, sont fixés sur un support inerte (tube ou puits de plaque de micro-titration en polystyrène, billes de verre, membrane). Ceux-ci captent les molécules de mycotoxine présentes dans le milieu par une réaction de type antigène-anticorps. Souvent l'utilisation d'un système enzymatique (E) couplé à un second anticorps permet de catalyser la transformation d'un substrat (S) chromogène en un produit coloré (P) (Figure 8).

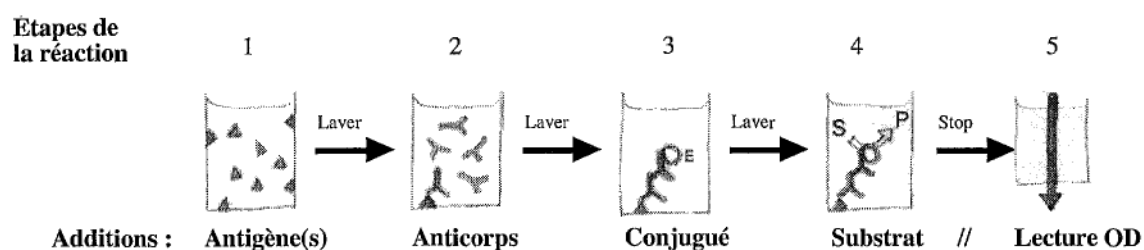


Figure 8 : Représentation schématique d'un test immunochimique (d'après Bordier, 2002).

La détection et/ou le dosage se fait par photométrie UV ou lecture visuelle (Dragacci et Frémy, 1999). Les modes opératoires sont simples à mettre en œuvre et bon marché. On se sert également, de plus en plus, du principe immunoenzymatique pour purifier l'extrait d'OTA sur colonne avant dosage.

4-2. Exemple d'immunopurification de l'ochratoxine A par un test industriel.

Le kit RIDA® Ochratoxin A column R 1303 contient 10 colonnes d'immunoaffinité à usage unique permettant la purification des échantillons avant le dosage de l'OTA. Ce kit sert pour la purification d'échantillon d'un gramme pour les céréales et malts et de 0,5 g pour le café torréfié si le protocole de préparation des échantillons est bien respecté (Document R-BIOPHARM Réf. R 1303).

	Céréales et malts	Café torréfié
Protocoles d'extraction	<p>Peser 10 g d'échantillon moulu dans un flacon à vis et ajouter 20 ml d'acétonitrile/eau (60/40 ; v/v). Mélanger pendant 20 minutes. Filtrer la solution sur papier filtre et conserver le filtrat. Ajouter 5 ml de n-heptane aux 5ml de filtrat. Centrifuger pendant 5 min à 3.000 g à température ambiante. Prélever la totalité de la phase supérieure d'heptane. Diluer 2 ml du filtrat dégraissé avec 13 ml de tampon PBS. Faire passer la totalité de la solution dans la colonne.</p>	<p>Peser 5 g de café torréfié (moulu) dans un tube à centrifuger de 50 ml. Ajouter 50 ml d'eau distillée bouillante et mélanger pendant 10 min. Laisser refroidir l'échantillon. Centrifuger pendant 10 min à 4.000 g à température ambiante, puis diluer avec 50 ml de PBS/méthanol (90/10 ; v/v). Faire passer 10 ml de la solution à travers la colonne.</p>

Tableau 16 : Protocole de préparation des échantillons pour la colonne RIDASCREEN®

La colonne contient un gel de sépharose auquel des anticorps monoclonaux spécifiques à l'OTA sont liés de façon covalente. On fait passer l'échantillon à travers la colonne. Si celui-ci est contaminé, l'OTA se fixe aux anticorps, les autres substances étant éluées. Puis le méthanol est employé comme éluant de l'OTA.

4-3. Les méthodes physico-chimiques

4-3.1. La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide en matière plastique ou aluminium. Après élution de la plaque, essentiellement par capillarité, les divers composants de l'échantillon à analyser se trouvent séparés.

Divers adsorbants sont employés en CCM tels le gel de silice, l'alumine, la cellulose.

La détection des composés se fait soit directement lorsqu'ils sont naturellement colorés, soit après révélation (UV, fluorescence, barrette diode, atomisation).

Concernant l'OTA, on révèle sous une lumière UV à 366 nm. On peut ainsi comparer la fluorescence obtenue par rapport à un étalon préalable et en déduire une certaine concentration.

4-3.2. La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la méthode de choix pour l'analyse de nombreuses mycotoxines. Cette méthode est actuellement la plus utilisée compte tenu de sa sensibilité de détection de l'ordre du ng ou du pg/kg d'échantillon.

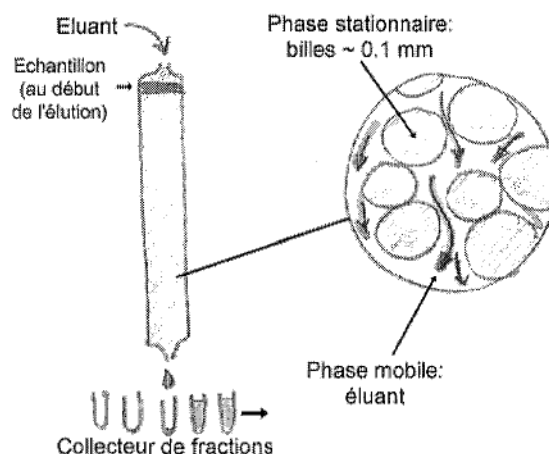


Figure 9: Principe de la chromatographie liquide haute performance (d'après Bordier, 2002).

La chromatographie en phase liquide est une méthode physico-chimique basée sur des différences d'interaction entre les substances à séparer, la phase mobile et la phase stationnaire permettant la séparation des diverses substances de l'échantillon à analyser. La détection et le dosage se font par UV ou fluorescence. De plus en plus, la confirmation de l'identité des substances analysées se fait par dérivation, barrette diode ou spectrométrie de masse.

Concernant l'OTA, les méthodes de confirmation sont résumées dans le tableau 17.

Méthode de confirmation	Analyse attendue par CLHP
Formation du méthyl-ester de l'OTA	Temps de rétention du méthyl-ester supérieur à celui de l'OTA
Action de la carboxypeptidase sur l'OTA	Absence de pic de rétention pour l'OTA mais présence d'un pic de rétention très faible correspondant à l'ochratoxine α .
Ajout d'une quantité définie d'ochratoxine A standardisée.	Temps de rétention identique mais pic plus important.

Tableau 17: Méthodes de confirmation de l'ochratoxine A (d'après Dragacci et Frémy, 1999).

La méthode d'analyse pour les liquides issus de raisin est très sensible et spécifique et passe par une purification sur colonne d'immunoaffinité avant un dosage par CLHP (Visconti *et coll.*, 2001).

Les grands groupes industriels ont mis en place des « plans d'autocontrôles de matières premières ». Ce sont des laboratoires indépendants qui gèrent les plans d'échantillonnages et de prélèvements sur des lots de plusieurs tonnes, à des dates définies par avance. L'analyse se fait par CLHP avec détecteur par fluorescence ($\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 470 \text{ nm}$) après extraction et purification de l'OTA sur colonne d'immunoaffinité.

Les colonnes d'immunoaffinité dans le commerce sont nombreuses et de prix variable (entre 200 et 600) (Tableau 18).

Compagnie	Nom du kit	Matières premières
Editek / Diagnostix	EZ Screen	Céréale, grain
Editek / Diagnostix	EZ-QUANT	Céréale, grain
Reidel-de Haen AG	ELIZA System for Ochratoxin A	Céréale, alimentation animale
r-Biopharm GmbH	RIDASCREEN Ochratoxin A	Céréale, alimentation animale, bière, sérum de porc
r-Biopharm GmbH	RIDASCREEN Ochratoxin A Column	Céréale, malt, café
r-Biopharm GmbH	RIDASCREEN Fast Ochratoxin A	Céréale et alimentation animale
Tepnel BioSystems Ltd.	BioKits Ochratoxin A Assay	Céréale, dérivé des céréales, fruit sec
Vicam LP	OchraTest	Café vert, vin blanc
		Café

Tableau 18 : Principaux tests d'immunopurification et/ou immunoenzymatique commercialisés.

Trois colonnes d'immunoaffinité ont été l'objet d'une étude comparative sur 11 échantillons de vins rouges et blancs par *Castellari et coll.* (2000) ; l'étude ne démontre aucune différence significative entre les types de colonne en terme de qualité de purification.

CHAPITRE 5

LÉGISLATION ET RÉGLEMENTATION SUR L'OCHRATOXINE A

5-1. Organismes internationaux.

Les législations dans le domaine des mycotoxines restent très peu développées, sauf peut-être dans le cas des aflatoxines où les normes sont bien établies pour tout type de produit (Comm. Europ., 2002b). Il existe des organisations internationales, sous couvert de l'ONU (Organisation des Nations Unies), qui essaient de proposer des seuils tolérables pour ces mycotoxines y compris l'ochratoxine A. La FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) a été créée en octobre 1945 dans le but d'améliorer l'état nutritionnel, le niveau de vie, la productivité agricole et le sort des populations rurales en général.

La FAO et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) se sont réunies pour former le JECFA (Comité Mixte FAO/OMS d'Experts des Additifs Alimentaires) qui s'occupe de l'évaluation des contaminants, des substances toxiques naturellement présentes et des résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (Boutrif et Canet, 1998; JECFA, 2001). En 1961, la FAO et l'OMS créaient la commission du *Codex Alimentarius* dans le but d'harmoniser les normes alimentaires. Ces trois organismes travaillent de concert afin d'améliorer, entre autres, la compréhension et la prise en charge globale des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale.

5-2. Normes européennes et étrangères

Pour prévenir la toxicité de l'OTA chez l'être humain et les animaux, plusieurs pays ont adopté, officiellement ou non, des limites tolérables maximales de cette mycotoxine dans divers aliments sachant que ceux-ci sont la source essentielle de contamination directe ou indirecte chez l'homme (Walker, 1999). Le tableau 19 résume ces limites.

Pays	Produit alimentaire	Limite maximale ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Référence
Argentine	Blé, orge, seigle, et produits	20	Comm. Codex
	dérivés		Alimentarius, 2002b
Autriche	Blé, seigle	5	Boutrif et Canet, 1998
Brésil	Riz, orge, haricots, maïs	50	Canet, 1999
Chypre	Tous	0,5	Boutrif et Canet, 1998
Hongrie	Conserves	0	—
Israël	Produits des céréales et des légumineuses	50	Canet, 1999
République Tchèque	Tous	20	Boutrif et Canet, 1998
	Aliments pour enfants	5	—
	Aliments pour nourrissons	1	—
Roumanie	Tous	5	—
Suisse	Céréales, vin, bière	5	Ordonnance de l'état fédéral suisse, 2000 ¹
	Fruits secs, épices	20	—
	Aliments pour nourrissons et enfants en bas âge	0,5	—
Uruguay	Riz, orge, café, maïs	50	Boutrif et Canet, 1998

Tableau 19 : Limites maximales tolérables de l'ochratoxine A dans divers aliments par pays (Boutrif et coll., 1998) (¹ La législation doit évoluer courant Mai 2002).

En Europe, la Commission Européenne a proposé au *Codex Alimentarius* le seuil tolérable en OTA de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour le blé, le seigle et l'orge (Comm. Europ., 2002c). Certains pays dépassent la réglementation en proposant des limites non encore définies par l'Union Européenne ; c'est le cas de l'Italie qui a fixé une limite de 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de bière (Pietri et coll., 2001), de 0,5 pour les aliments destinés aux nourrissons, 8 dans le café vert, 4 dans le café soluble et torréfié, 0,5 dans les graines de cacao et ses dérivés et 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans la viande de porc et ses dérivés (Visconti, 2000).

Dernièrement, un règlement européen portant fixation des teneurs en OTA de certains aliments, est paru au journal officiel des communautés européennes (Comm. Europ., 2002c ; annexe 2) et donc applicable dans tous les états membres dès le 5 avril 2002. Le voici résumé dans le tableau 20.

Produit	Teneurs maximales (µg/kg ou ppb)	Mode de prélèvement des échantillons	Méthode d'analyse de référence
Grain de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin).	5	Directive 2002/27/CE	Directive 2002/27/CE
Tous les produits dérivés de céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation humaine directe).	3	Directive 2002/27/CE	Directive 2002/27/CE
Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs).	10	Directive 2002/27/CE	Directive 2002/27/CE
Café vert et torréfié et produits à base de café, vin, bière, jus de raisin, cacao et produits à base de cacao et d'épices.	ND*		

Tableau 20: Teneur maximale en ochratoxine A dans l'Union Européenne (*ND = Non déterminé) (Comm. Europ., 2002c).

Les évaluations et réévaluations de tous ces produits doivent se faire au plus tard le 31 décembre 2003 selon le règlement 472/2002 de la commission européenne. De plus, des programmes coordonnés d'inspection dans le domaine de l'alimentation animale ont été décidés afin de prévenir les contaminations indirectes (Comm. Europ., 2002d).

CHAPITRE 6

STRATÉGIE ET MÉTHODE DE PRÉVENTION ET/OU DE DÉCONTAMINATION

La FAO a publié un rapport montrant que la production des denrées agricoles n'est pas suffisante pour subvenir aux besoins de la population mondiale. De plus, au moins un quart de la récolte mondiale est contaminé par des mycotoxines (Lopez-Garcia *et coll.*, 1999). La prévention des pertes de récoltes engendrées par les mycotoxines révèle ici toute son importance.

6-1. Méthodes de décontamination

Les méthodes de décontamination concernent essentiellement les graines d'oléagineux. Elles doivent être suffisamment efficaces pour réduire de façon significative la teneur en ochratoxine A sans altérer les qualités alimentaires et caractères organoleptiques propres à chaque aliment. La prise en compte du coût des procédés est importante car les tonnages sont importants. Outre le triage manuel ou mécanisé, des méthodes chimiques peuvent être employées mais sont interdites en alimentation humaine (Dragacci).

Diverses expériences d'irradiation ont été menées pour réduire le taux d'OTA (Deberghes *et coll.*, 1995) :

- Une disparition totale d'OTA a été observée sur un inoculum d'*Aspergillus* pendant un temps d'irradiation par les UV B de 30 minutes à 4 heures.

- Une irradiation par rayons γ de 2 ou 3 kGy provoque une augmentation du taux d'OTA produite.

Ce taux se réduit de 60% dès 4 kGy dans un milieu liquide, et l'OTA a complètement disparu à 5kGy. Par contre dans un milieu solide, l'effet se manifeste dès 2kGy : réduction de 75% de la quantité d'OTA.

La carboxypeptidase A réduit de façon significative (100% pour 100 UI) l'OTA produite. Les méthodes industrielles et les tests d'innocuité de cette enzyme chez l'homme restent à démontrer.

Lors de congélations lentes à -20°C , puis de décongélations répétées, on observe une production d'ochratoxine A réduite de 10 à 45%. Cette réduction s'explique par des lésions du mycélium par la formation de cristaux de glace. L'effet ne dépend pas de la durée, ni du nombre de cycles de décongélation congélation, par contre la congélation dans l'azote conserve l'OTA, ne la détruisant pas (Deberghes *et coll.*, 1995).

L'ochratoxine A est partiellement dégradée dans des conditions normales de cuisson, mais peut aussi être transformée en 3S-OTA (épimère 3S de l'OTA) qui est 10 fois moins toxique que l'ochratoxine A (Bruinink *et coll.*, 1997). La cuisson infra-rouge réduit de plus de 90 % la teneur en OTA (Boivin, 1997).

Scott a rapporté que le chauffage de la farine blanche à 250°C pendant 40 minutes permet une réduction de 76 % de la teneur en ochratoxine A (Scott, 1984). Néanmoins, de nombreuses mycotoxines, y compris l'ochratoxine A, ne seraient pas dégradées suffisamment dans les conditions industrielles normales de cuisson tels le pain ou les biscuits (Scott, 1998). Boudra *et coll.* (1995) montrèrent une réduction de la teneur en OTA plus importante et plus rapide sur blé mouillé à 200°C de l'ordre de 25 à 95% selon la teneur initiale en OTA que sur blé sec à 100°C (2 à 20%).

Pour le café, la torréfaction diminue de façon significative la teneur en ochratoxine A, cette réduction étant estimée en moyenne à 69% (Van Der Stegen *et coll.*, 2001). Le tableau 21 résume les réductions obtenues par type de café.

Type de café	OTA dans le café vert (ppb)	OTA dans le café torréfié (ppb)	Réduction (%)
Robusta d'Ouganda	0,9	0,63	30
Conillon	4	0,3	90
Robusta Côte d'Ivoire	4,9	1,5	69
Robusta de Thaïlande	7,3	1,4	84
Zaire	8,6	0,2	96
Robusta Côte d'Ivoire	9,91	2,11	79
Arabica d'Éthiopie	18,4	1,9	89

Tableau 21 : Réduction de l'OTA pendant la torréfaction (d'après Van Der Stegen *et coll.*, 2001).

Pour la bière, le procédé de maltage n'a pas d'influence sur la teneur en OTA et les quantités présentes se retrouvent dans le malt. Une réduction de 80 et 50 % est observée respectivement lors des procédés de brassage et fermentation. Au final, c'est bien 30 à 40 % de l'ochratoxine A présente dans l'orge qui se retrouve dans la bière (Boivin, 1997).

Castellari *et coll.* (2001) ont étudié la réduction du taux d'OTA par collage des vins (méthode basée sur l'adjonction de produits afin d'éclaircir le vin). Dix-huit agents ont été testés et plusieurs d'entre eux sont capables de réduire de façon significative le taux d'OTA ; mais ils modifient aussi les paramètres organoleptiques du vin. Le collage par caséinate de potassium réduit de 82% le taux d'ochratoxine A mais c'est le charbon activé qui a la préférence des auteurs car il adsorbe nettement moins les polyphénols. D'autres études de collage sont en cours mais il semblerait que les résultats soient peu convaincants et les caractères organoleptiques du vin considérablement modifiés (Blateyron *et coll.*, 2001).

6-2. Méthodes de prévention

Les méthodes de lutte contre la contamination de l'ochratoxine A passent essentiellement par des méthodes de prévention. Les méthodes de prévention actuelles sont fondées sur les bonnes pratiques agricoles et de fabrication à toutes les étapes de l'élaboration du ou des produits destinés à la consommation humaine et/ou animale. Elles concernent essentiellement la prévention de la contamination des céréales avant et pendant la récolte, pendant l'entreposage et le transport, mais peuvent être appliquées à l'ensemble des denrées potentiellement contaminables. Les principaux objectifs sont décrits dans le tableau 22.

Stade des procédés	Prévention à apporter
Avant la récolte	Rotation et propreté des cultures. Création de plantes résistantes aux moisissures. Utilisation de fongicides, d'insecticides. Arrosage adapté. Apport en éléments nutritifs suffisant pour éviter le stress.
Pendant la récolte	Récolter à maturité les grains et hors temps humide Eliminer les grains endommagés.
Entreposage	Abriter les grains des nuisibles, des variations climatiques. Activité en eau < 0,70 et température contrôlée sinon séchage des grains. Contrôle périodique de paramètres multiples et consignation par écrit.
Transport	Abriter les grains des nuisibles, des variations climatiques. Conteneurs propres et secs.

Tableau 22: Méthode de prévention contre la contamination (d'après Pfohl-Leszkowiz, 1999 ; Com. codex alimentarius, 2002a).

Entre toutes ces étapes, les conteneurs, matériels de transport, de stockage doivent être systématiquement nettoyés, désinfectés et séchés.

Pour les étapes de transformation, des contrôles industriels réguliers doivent être mis en œuvre afin de garantir la sécurité sanitaire des aliments (Annexe 3).

Un système de gestion complémentaire, le système HACCP (Système de l'analyse des risques – Points critiques pour leur maîtrise) acquiert un rôle croissant dans la maîtrise des mycotoxines (Frank, 1999 ; Park *et coll.*, 1999 ; Comm. codex alimentarius., 2002a).

Le concept HACCP repose sur les sept principes suivants :

- 1- Procéder à une analyse des dangers et identifier des mesures préventives.
- 2- Déterminer les points critiques de contrôle (CCP).
- 3- Etablir le(s) seuil(s) critique(s).
- 4- Surveiller chaque CCP.
- 5- Déterminer les mesures correctives à prendre, en cas de dépassement d'un seuil critique.
- 6- Etablir un système d'enregistrement.
- 7- Etablir des procédures de vérification.

Il est difficile de mettre au point et d'appliquer le système HACCP mais la FAO met à la disposition des pays qui le souhaitent une formation de techniciens qualifiés pour la compréhension et la gestion de ce concept (Park *et coll.*, 1999). Une bibliographie complète publiée par la FAO est à disposition des pays qui le souhaitent.

C'est donc par les bonnes pratiques agricoles et de fabrication ainsi qu'avec la mise en place du concept HACCP que la prévention des risques liés aux mycotoxines sera optimale.

CONCLUSION

Thèse soutenue par M. BERTRAND Laurent

Titre : Ochratoxine A et aliments : Quel risque pour la santé humaine ?

CONCLUSION

Au sein de la grande famille des mycotoxines, métabolites fongiques secondaires, le groupe des ochratoxines (l'ochratoxine A étant la toxine prépondérante) tient une place importante ; ces toxines sont produites par diverses souches fongiques des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Au cours de cette dernière décennie, le statut taxonomique des *Penicillium* ochratoxinogènes a été modifié et précisé soulignant ainsi l'importance de la taxonomie dans l'identification des moisissures productrices d'ochratoxine A.

La présence naturelle de l'ochratoxine A a été observée dans divers produits destinés à l'alimentation animale et humaine, en particulier dans les pays tempérés, entraînant un regain d'intérêt et de recherche relatif à la santé publique. Diverses études ont montré que l'ochratoxine A présente diverses toxicités *in vitro* et *in vivo* chez l'animal (néphrotoxique, hépatotoxique, tératogène et cancérigène).

Vis à vis de l'homme, il existe actuellement de fortes présomptions d'un lien entre la présence de l'ochratoxine A dans les aliments, sa toxicité et l'apparition de pathologies humaines (principalement, une maladie rénale fatale et irréversible dénommée "néphropathie endémique des Balkans").

La contamination humaine se faisant par l'ingestion d'aliments préalablement contaminés, des mesures prophylactiques au niveau du stockage et de la transformation des aliments ainsi que des nouvelles mesures réglementaires sur la teneur maximale des produits en ochratoxine A ont été prises et/ou renforcées. La première mesure réglementaire à l'échelle européenne vient tout juste d'être publiée (mars 2002).

Ces nouvelles normes font suite aux évaluations du risque de l'ochratoxine A vis à vis de la santé humaine et bénéficient du développement et du perfectionnement des méthodes d'analyse et de dosage de l'ochratoxine A. Ces méthodes permettent de répondre aux exigences de ces normes en détectant d'une manière fiable cette toxine à des concentrations très faibles allant jusqu'à 0,5 ppb.

Face aux principales contaminations de l'ochratoxine A dans les céréales, café, viande et vin, la stratégie actuelle s'oriente plutôt vers une prévention de la contamination des denrées par des

moyens peu coûteux (trilage manuel et/ou automatique, séchage des grains à température optimale) que vers une décontamination par des moyens dont le rapport coût/efficacité est défavorable.

En terme de santé publique, la contamination fréquente et hétérogène de l'ochratoxine A ainsi que sa toxicité intrinsèque justifient pleinement la poursuite des recherches ; elles concernent, en autres, ses mécanismes d'action génotoxique et cancérogène, ainsi que les liens de cause à effet entre sa présence dans l'alimentation et l'apparition de pathologies humaines. Si les études ultérieures confirmaient dans les années à venir les fortes suspicions à l'égard de l'ochratoxine A, sa classification selon le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) pourrait être réexaminée.

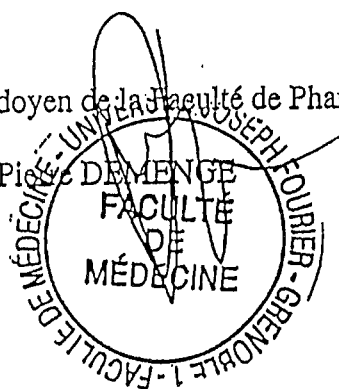
En attendant des données scientifiques plus précises, la prévention de la contamination par l'ochratoxine A doit passer par de bonnes pratiques agricoles et de transformations alimentaires ainsi que la mise en place de systèmes d'assurance qualité (HACCP). Ces moyens semblent être les principaux remparts actuels contre le risque potentiel de l'ochratoxine A vis à vis de la santé humaine.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 5 juin 2002

Le doyen de la Faculté de Pharmacie

Pr. Pierre DEMENGE



Le président de la thèse

M. Serge KRIVOBOK

BIBLIOGRAPHIE

Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G. & Cabanes F.J., 1994. Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** : 2650-2652.

Accensi F., Abarca M.L., Cano J., Figuera L. & Cabanes F.J., 2001. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **793** : 65-70.

Arlt V.M., Pfohl-Leszkowicz A., Cosyns J. & Schmeiser H.H., 2001. Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy. *Mutat. Res.*, **494** : 143-150.

Atroschi F., Biese I., Saloniemi H., Ali-Vehmas T., Saari S., Rizzo A. & Veijalainen P., 2000. Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **3** : 281-291.

Austwick P.K., 1975. Balkan Nephropathy. *Proc. R. Soc. Med.*, **68** : 219-221.

Aziz N.H. & Moussa L.A., 1997. Influence of white light, near-UV irradiation and other environmental conditions on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* and ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Nahrung. Jun.*, **41** : 150-154.

Aziz N.H., Youssef Y.A., El-Fouly M.Z. & Moussa L.A., 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **39** : 279-285.

Bacon C.W., Sweeney J.G., Robbins J.D. & Burdick D., 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. *Appl. Microbiol.*, **26** : 155-160.

Baumann U. & Zimmerli B., 1988. Einfache ochratoxin-A-Bestimmung in Lebensmitteln. *Mitt. Geb. Lebensmit. Hyg.*, **79** : 157-158.

Baudrimont I., Betbeder A.M., Gharbi A., Pfohl-Leszkowicz A., Dirheimer G. & Creppy E.E., 1994. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by the sub-chronic administration of ochratoxin A in rats *Toxicol.*, **89** : 101-111.

Baudrimont I., Murn M., Betbeder A.M., Guilcher J. & Creppy E.E., 1995. Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Toxicol.*, **95** : 147-154.

Bauer J. & Gareis M., 1987. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Zentrabl. Veterinärmed.*, **34** : 613-627.

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

Betina V., 1989a. Trichothecenes. In : Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Ed., Betina V., Bioactive molecules, vol. 9, Mycotoxins. Elsevier, Amsterdam, pp. 192-241.

Betina V., 1989b. Citrinin. In : Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Ed., Betina V., Bioactive molecules, vol. 9, Mycotoxins. Elsevier, Amsterdam, pp. 174-191.

Betina V. 1989c. Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In : Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Ed., Betina V., Bioactive molecules, vol. 9, Mycotoxins. Elsevier, Amsterdam, pp. 151-173.

Bhat R. V. & Vasanthi S., 1999. Contamination de l'alimentation humaine et animale par les mycotoxines : Aperçu, fréquence et retombées économiques sur les disponibilités alimentaires et le commerce, exposition des animaux domestiques et pertes économiques qui s'ensuivent. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/4a.

Biro K., Solti L., Banra-Vetro I., Bago G., Glavits R., Szabo E. & Fink-Gremmels J., 2002. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Patho.*, **31** : 141-148.

Blanc M., Pittet A., Munoz-Box R. & Viani R., 1998. Behavior of Ochratoxin A during Green Coffee Roasting and Soluble Coffee Manufacture. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 673-675.

Blateyron L., Michel G. & Delteil D., 2001. Maîtrise des contaminants dans les vins : cas de l'Ochratoxine A. Doc. Internet : <http://www.icv.fr/kiosque/actu/actu6.htm>

Boivin P., 1997. L'ochratoxine, la citrinine et la sterigmatocystine dans les céréales françaises et leur devenir au cours de procédés de transformations agro-alimentaires. Rapport final. Doc. Internet : <http://www.acta.asso.fr/cr/cr9729.htm>

Bordier C., 2002. Cours de biochimie 1, hiver 2001-2002. Doc. Internet : <http://www.bordier.ch/uni/bioch1/ELISA.htm>

Boudra H., Le Bars P. & Le Bars J., 1995. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** : 1156-1158.

Boutrif E. & Canet C., 1998. Mycotoxin prevention and control : FAO programmes. *Rev. Méd. Vét.*, **149**, 681-694.

Bragulat M.R., Abarca M.L., Accensi F. & Cabañes F.J., 1998. New screening method for ochratoxigenic mold in pure cultures. *Rev. Méd. Vét.*, **149**, 515.

Breitholtz A., Olsen M., Dahlback A. & Hult K., 1991. Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Addit. Contam.*, **8** : 183-192.

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

Bruinink A., Rasonyi T. & Sidler C., 1997. Reduction of ochratoxin A toxicity by heat-induced epimerization. In vitro effects of ochratoxins on embryonic chick meningeal and other cell cultures. *Toxicology*, **118** : 205-210.

Budavari S., 1989. The merck Index, 11th ed. Rahway, NJ, Merck & Co., pp. 1068.

Bukvic D., Jankovic S., Dukanovic L. & Marinkovic J., 2000. Survival of Balkan endemic nephropathy patients. *Nephron*, **86** : 463-466.

Canet C., 1999. Réglementation mondiale. In : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 409-428.

Castegnaro M., Michelon J., de Meo M. & Laget M., 1991. Destruction of ochratoxin A and citrinin using sodium hypochlorite. *IARC Sci. Publ.*, **113** : 9-16.

Castellari M., Fabbri S., Fabiani A., Amati A. & Galassi S., 2000. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *J. Chromatogr. A.*, **888** : 129-136.

Castellari M., Versari A., Fabiani A., Parpinello G.P. & Galassi S., 2001. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *J. Agric. Food Chem.*, **49** : 3917-3921.

Chelkowski J., Golinski P., Godlewska B., Radomska W., Szebiotko K. & Wiewiorowska M., 1981. Mycotoxins in cereal grain. 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. & Wiewiorowska M., 1982. Mycotoxins in cereal grain. Part 5. Changes of cereal grain biological value after ammoniation and mycotoxins (ochratoxins) inactivation. *Nahrung.*, **26** : 1-7.

Commission des communautés européennes, 1997. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. Reports on tasks on Scientific Cooperation. EUR 17523 EN, Revised edition, November 1997.

Commission des communautés européennes, 1998a. Directive 98/53/ce de la commission du 16 juillet 1998 portant fixation de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*. L 201 pp. 93-101.

Commission des communautés européennes, 1998b. Règlement (ce) no 1525/98 de la commission du 16 juillet 1998 modifiant le règlement (CE) no 194/97 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*, L 201 pp. 43-46.

Commission des communautés européennes, 2000. Observations de la Communauté européenne adressées au Comité du codex sur les additifs alimentaires et contaminants. Projet de limites maximales pour l'ochratoxine A dans les céréales et les produits céréaliers. Doc. Internet : http://europa.eu.int/comm/food/fs/ifsi/eupositions/ccfac/archives/ccfac-cx-18-ec-comments-130300final_fr.pdf.

Commission des communautés européennes, 2002a. Directive 2002/26/CE de la commission du 13 mars 2002 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en ochratoxine A des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*. L 75 pp. 38-43.

Commission des communautés européennes, 2002b. Règlement (CE) n° 257/2002 de la commission du 12 février 2002 modifiant le règlement (CE) n° 194/97 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires et le règlement (CE) n° 466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires *Journal officiel des Communautés européennes*. L 41 pp. 12-15.

Commission des communautés européennes, 2002c. Règlement (CE) n° 472/2002 de la commission du 12 mars 2002 modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires *Journal officiel des Communautés européennes*. L 75 pp. 18-20.

Commission des communautés européennes, 2002d. Recommandation (CE) n° 214/2002 de la commission du 12 mars 2002 sur les programmes coordonnés d'inspection dans le domaine de l'alimentation animale pour l'année 2002 conformément à la directive 95/53/CE du Conseil. *Journal officiel des Communautés européennes*. L 70 pp. 20-22.

Commission des communautés européennes, 2002e. European community comments for the codex committee on food additives and contaminants. Agenda item 15a- Comments on the draft maximum level for Ochratoxin A in Wheat, Barley and rye and derived products submitted in response to CL 2001/34-FAC (CX/FAC 02/18). Doc. Internet : http://europa.eu.int/comm/food/fs/ifsi/eupositions/ccfac/ccfac_ec-comments_item15a_en.pdf.

Commission du Codex Alimentarius, 2000. Document CX/FAC 00/17. Avant-projet de code d'usages pour la prévention de la contamination des céréales par l'ochratoxine A. Doc. Internet : ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac32/fa00_17f.pdf

Commission du Codex Alimentarius, 2002a. Document CX/FAC 02/21. Avant-projet de code d'usages en matière de prévention (réduction) de la contamination des céréales par les mycotoxines, y compris les appendices sur l'ochratoxine A, la zéaralénone, les fumonisines et les trichothécènes. Doc. Internet : ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac34/fa02_21f.pdf

Commission du Codex Alimentarius, 2002b. Document CX/FAC 02/18. Projet sur la teneur maximale en ochratoxine dans le blé, l'orge et le seigle ainsi que dans les produits dérivés. Doc. Internet : ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac34/fa02_18f.pdf

Creppy E.E., Rosenthaler R. & 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. & 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., Betbeder A.M., Gharbi A., Counord J., Castegnaro M., Bartsch H., Moncharmont P., Fouillet B. & Chambon P., 1993. Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France : Alsace, Aquitaine et Rhône-Alpes. In : Human ochratoxins and its

pathologies. Eds., Creppy E.E., Castegnaro M. & Dirheimer G., Montrouge, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, **231**, pp. 147-158.

Creppy E.E., Baudrimont I. & Betbeder A.M., 1995. Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. *Toxicol. Letters*, **83** : 869-877.

Creppy E.E., Baudrimont I., Belmadani A. & Betbeder A.M., 1996. Aspartame as a preventive agent of chronic toxic effects of ochratoxin A in experimental animals. *Food Addit. Contam.*, **13** : 51-52.

Creppy E.E., Baudrimont I. & Anne-Marie., 1998. How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *J. Toxicol. Sci.*, **23** : 165-172.

Curtui V.G., Gareis M., Usleber E. & Martlbauer E., 2001. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Addit. Contam.*, **18** : 730-738.

Curtui V.G. & Gareis M., 2001. A simple HPLC method for the determination of the mycotoxins ochratoxin A and B in blood serum of swine. *Food Addit. Contam.*, **18** : 635-643.

Dahlmann A., Dantzer W.H., Silbernagl S. & Gekle M., 1998. Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286** : 157-162.

Deberghes P., Betbeder A.M., Boisard F., Blanc R., Delaby J.F., Krivobok S., Steiman R., Seigle-Murandi F. & Creppy E.E., 1995. Detoxification of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. *Mycoto. Res.*, **11** : 37-47.

De Groene E.M., Hassing I.G., Blom M.J., Seinen W., Fink-Gremmels J. & Horbach G.J., 1996. Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Res.*, **56** : 299-304.

Delacruz L. & Bach P.H., 1990. The role of ochratoxin metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. *J. Biopharm. Sci.*, **1** : 277-304.

DGCCRF, 1999. Recherche d'ochratoxine A dans les jus de raisin et dans les bières. Doc internet : http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/consommation/contrôles_alimentaires/actions/ochratoxine0401.htm

DGCCRF, 1999. Ochratoxine A dans les jus de raisin Doc. Internet : <http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/activites/labs/1999/crota.htm>

DGCCRF, 2000. Ochratoxine A dans les vins du grand Sud-Ouest et de la vallée de la Loire. Doc. Internet : <http://www.finances.gouv.fr/DGCCRF/activites/labs/2000/ochratoxine.htm>

Direction de la santé Bulletin officiel n° 99/26 Doc. Internet : <http://www.sante.gouv.fr/adm/dagpb/bo/1999/99-26/a0261720.htm>

Dirheimer G., 1996. Mechanistic approaches to ochratoxin toxicity. *Food Add. Contam.*, **13** : 43-44.

Dirheimer G., 1998. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Revue Méd. Vét.*, **149** : 605-616.

Dörrenhaus A. & Follmann W., 1997. Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Arch. Toxicol.*, **71** : 709-713.

Dragacci S. In : Mycotoxines. Risques potentiels liés à la présence de mycotoxines dans les plantes. AFSSA/LER Hygiène et Qualité des aliments/Unité Toxines microbiennes. Doc. Internet : <http://www.afssa.fr/ftp/colloques/ogm1/04.pdf>

Dragacci S. & Frémy J.M., 1999. Techniques analytiques pour la recherche des mycotoxines dans les aliments. In : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 141-172.

Dragacci S., Grosso F., Bire R., Fremy J.M. & Coulon S., 1999. A French monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys. *Nat. Toxins*, **7** : 167-173.

Eko-Ebongue S., Antalick J.P., Bonini M., Betbeder A.M., Faugere J.G., Maaroufi K., Bacha H., Achour M., Grosse Y., Pfohl-Leszkowicz A. & Creppy E.E., 1994. Détermination des teneurs en Ochratoxine A, vitamine E et vitamine A dans des sérums humains de France et de Tunisie : recherche d'une corrélation. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **929** : 213-224.

Elling F., 1979. Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy: alterations in enzyme activity in tubular cells. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **87** : 237-243.

FAO, 1998. Food Quality and Safety Systems - A Training Manual on Food Hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) System. Ed., Publishing Management Group, FAO Information Division. ROME, FAO.

FAO/WHO, 1991. Ochratoxin A : Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. In : 37th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, **806**, 365-417.

FAO/WHO, 1996. Ochratoxin A : Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. In : 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives *WHO Technical Report Series*, **859**, 363-376.

FAO/WHO, 2001. Ochratoxin A : Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants. In : 56th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Doc. Internet : <http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/esn/jecfa/jecfa56.pdf>

Filali A., Ouammi L., Betbeder A.M., Baudrimont I., Soulaymani R., Benayada A. & Creppy E.E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit. Contam.*, **18** : 565-568.

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

Franck M., 1999. Prévention des mycotoxines et décontamination : Le système HACCP et son rôle possible dans la maîtrise des mycotoxines : évaluation de l'ochratoxine A dans la production de café. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/6c.

Frohlich A.A., Marquardt R.R. & Ominski K.H., 1991. Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain : a Canadian perspective. In : *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., N° 115, pp. 139-143.

Fuchs R., Radic B., Ceovic S., Sostaric B. & Hult K., 1991. Human exposure to ochratoxin A. In : *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., N° 115, pp. 131-134.

Galtier P., Baradat C. & Alvinerie M., 1977. Secretion of ochratoxin A in rabbit milk. *Ann. Nutr. Aliment.*, **31** : 911-918.

Galtier P., 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Revue Méd. Vét.*, **149** : 549-554.

Gareis M., Martlbauer E., Bauer J. & Gedek B., 1988. Bestimmung von Ochratoxin A in Muttermilch. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **186** : 114-117.

Gautier J., Richoz J., Welti D.H., Markovic J., Gremaud E., Guengerich F.P. & Turesky R.J., 2001. Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, **14** : 34-45.

Gekle M., Mildenerger S., Freudinger R. & Silbernagl S., 1994. The mycotoxin ochratoxin-A impairs protein uptake in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271** : 1-6.

Gekle M. & Silbernagl S., 1994. The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity *in vivo*, toxodynamic and toxokinetic aspects. *Renal Physiol. Biochem.*, **17** : 40-49.

Gekle M., Schwerdt G., Freudinger R., Mildenerger S., Wilflingseder D., Pollack V., Dander M. & Schramek H., 2000. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293** : 837-844.

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

Gilbert J., 1999. Assurance qualité dans l'analyse des mycotoxines. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/9. 1999

Golinski P. & Grabarkiewicz-Szczesna J., 1985. The first Polish cases of detection of ochratoxin A residues in human blood. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, **36** : 378-381.

Golinski P., Grabarkiewicz-Szczesna J., Chelkowski J., Hult K. & Kostecki M., 1991. Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland. In : *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., n° 115, pp. 153-158.

Gross-Steinmeyer K., Weymann J., Hege H.G. & Metzler M., 2002. Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.*, **50** : 938-945

Groves C.E., Nowak G. & Morales M., 1999. Ochratoxin A secretion in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10** : 13-20.

Hald B., 1991. Ochratoxin A in human blood in European countries. In : *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., n° 115, pp. 159-164.

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

Harris J.P. & Mantle P.G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* ; **58**, 709-716.

Harwig J. & Chen Y.K., 1974. Some conditions favoring production of ochratoxin A and citrinin by *Penicillium viridicatum* in wheat and barley. *Can. J. Plant. Sci.*, **54** : 17-22.

Hayes A.W., Hood R.D. & Lee H.L., 1974. Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. *Teratology*, **9** : 93-97.

Heintz J.-M., 1999. Réglementation européenne. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 429-450.

Herman J.L. & Walker R., 1999. Analyse des risques liés aux mycotoxines effectuée par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA). Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/7b.

Höhler D., 1998. Ochratoxin A in food and feed occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss* ; **37**, 2-12.

Horvath A., Upham B.L., Ganey V. & Trosko J.E., 2002. Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicol.*, **40** : 273-282.

Hrabar A., Ceovic S., Aleraj B., Cvorisec D. & Hall P.W. 3rd., 1991. Relationship of anemia to Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int. Suppl.*, **34** : 44-45

Hübner M., Vrabcheva T. & Gareis M., 1998. Simultaneous detection of ochratoxin A and B in spices and herbs by immunoaffinity column clean up and HPLC. *Revue Méd. Vét.*, **149** : 507.

Hult K., Hokby E., Gatenbeck S. & Rutqvist L., 1980. Ochratoxin A in blood from slaughter pigs in Sweden : use in evaluation of toxin content of consumed feed. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** : 828-830.

Hult K., Plestina R., Habazin-Novak V., Radic b. & Ceovic S., 1982. Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch. Toxicol.*, **51** : 313-321.

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

Humbert F., 2001. Cafés arabica. *Que Choisir*, **379** : 42-47

Huwig A., Freimund S., Kappeli O. & Dutler H., 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol Lett.*, **122** : 179-188.

IARC (Centre international de recherche sur le cancer), 1993. Ochratoxin A. In : IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substance : Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and Mycotoxines. IARC Lyon Ed., n° 56, pp. 489-521.

JECFA, 2001. Fiche d'information. Doc. Internet : <http://www.fao.org/es/ESN/Jecfa/what-f.pdf>

Jonsson N. & Pettersson H., 1999. Evaluation of different preservation methods for cereal grain based on occurrence of moulds and mycotoxins (en Suédois). JTI-rapport, Lantbruk och Industri Nr 263, Jordbrukstekniska institutet, Uppsala, Suède.

Kane A., Creppy E.E., Roschenthaler R. & Dirheimer G., 1986. Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology*, **42** : 233-243.

Kerkadi A., Barriault C., Tuchweber B., Frohlich A.A., Marquardt R.R., Bouchard G. & Yousef I.M., 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 A.*, **53** : 231-250.

Krivobok S., Olivier Ph., Marzin D.R., Seigle-Murandi F. & Steiman R., 1987. Study of the genotoxic potential of 17 mycotoxins with the SOS Chromotest. *Mutagenesis.*, **2** : 433-439.

Krivobok S., Seigle-Murandi F., Steiman R. & Creppy E., 1995 Fungal flora and ochratoxin A production in various food and feed in France. *System. Appl. Microbiol.*, **18** : 455-459.

Krogh P., 1972. Mycotoxic porcine nephropathy : a possible model for Balkan Endemic Nephropathy. In : Endemic nephropathy. Eds., Pulchev A., Dinev I.V., Milev B. & Doichinov D., Sofia, Bulgarian Academic of Science, pp. 266-270.

Krogh P., Axelsen N.H., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B., Hyldgaard-Jensen J., Larsen A.E., Madsen A., Mortensen H.P., Moller T., Petersen O.K., Ravnskov U., Rostgaard M. & Aalund O., 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., 1976b. Mycotoxic nephropathy. In : Advances in veterinary science and comparative medicine. New York, Academic Press, Vol. 20, pp. 147-170.

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

Krogh P., 1987. Ochratoxin in food. In : Mycotoxins in Food. Ed. Krogh P., London, Academic Press, pp. 97-121.

Krogh P., 1992. Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.*, **30** : 213-224.

Kuczuk M.H., Benson P.M., Heath H. & Hayes A.W., 1978. Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **53** : 11-20.

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

Kuiper-Goodman T., 1999. Méthode d'analyse des risques liés aux mycotoxines dans les produits alimentaires. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUF sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/7a. 1999

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.

Lai M., Semenik G. & Hesseltine C.W., 1970. Conditions for productions of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **19** : 542-544.

Larsen T.O., Svendsen A. & Smedsgaard J., 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** : 3630-3635.

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

Lebrun S. & Follmann W., 2002. Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch. Toxicol.*, **75** : 734-741.

Leoni L.A., Soares L.M. & Oliveira P.L., 2000. Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Addit. Contam.*, **17** : 867-870.

Lopez-Garcia R. & Park R., 1999. Systèmes de gestion intégrée des mycotoxines. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/6a.

Lopez-Garcia R., Park D.L. & Gutierrez de Zubiaurre M.B., 1999. Procédés pour réduire la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires. In : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 387-408.

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

MacDonald S., Wilson P., Barnes K., Damant A., Massey R., Mortby E. & Shepherd M.J., 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Addit. Contam.*, **16** : 253-260.

MacMasters D.R. & Vedani A., 1999. Ochratoxin binding to phenylalanyl-tRNA synthetase: computational approach to the mechanism of ochratoxicosis and its antagonism. *J. Med. Chem.*, **42** : 3075-3086.

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

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods), 1997. Survey of afflictions and ochratoxin A in cereals and retail products. Food surveillance Information Sheet No. 130.

Maleysson F., 2001. Produits bio : À boire et à manger. *Que Choisir*, **383** : 16-23.

Markaki P., Delpont-Binet C., Grosso F. & Dragacci S., 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *J. Food Prot.*, **64** : 533-537.

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

Micco C., Grossi M., Miraglia M. & Brera C., 1989. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Addit. Contam.*, **6** : 333-339.

Micco C., Ambruzzi M.A., Miraglia M., Brera C., Onori R. & Benelli L., 1991. Contamination of human milk with ochratoxin A. In : Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., n° 115, pp. 105-108.

Micco C., Miraglia M., Brera C., Corneli S. & Ambruzzi A., 1995. Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. *Food Addit. Contam.*, **12** : 351-354.

Milanez T.V. & Leitao M.F., 1996. The effect of cooking on ochratoxin A content of beans, variety 'Carioca'. *Food Addit. Contam.*, **1** : 89-93.

- Moss, M. O., 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **13** : 5-9.
- Nakajima M., Tsubouchi H. & Miyabe M., 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **82** : 897-902.
- Neal G.E., 1998. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity *Revue méd. Vét.*, **149** : 555-560.
- Nicol B., Bony M., Gallagher M. & Donnelly C., 1998. Experience in the development of mycotoxin methods using different test formats and food matrices. *Revue méd. Vét.*, **149** : 511.
- Nicol B., Donnelly C., Dragacci S., Jorgensen K., Williams A. & Boenke A., 1998. Development of an extraction method for ochratoxin A in pig kidney using Ochraprep® immunoaffinity columns. *Revue méd. Vét.*, **149** : 512.
- Norred P. & Tiley T. R., 1999. Prévention des mycotoxines et décontamination : Maïs – étude de cas. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/6b.
- Obrecht-Pflumio S., Chassat T., Dirheimer G. & Marzin D., 1999. Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutat. Res.*, **446** : 95-102.
- Obrecht-Pflumio S. & Dirheimer G., 2000. In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chem. Biol. Interact.*, **127** : 29-44.
- Obrecht-Pflumio S. & Dirheimer G., 2001. Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A. *Arch. Toxicol.*, **75** : 583-590.
- O'Brien E., Heussner A.H. & Dietrich D.R., 2001. Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicol. Sci.*, **63** : 256-264.
- Odhav B. & Naicker V., 2002. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit. Contam.*, **19** : 55-61.
- Olsson J., Borjesson T., Lundstedt T. & Schnurer J., 2002. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.*, **72** : 203-214.
- Omar R.F., Gelboin H.V. & Rahimtula A.D., 1996. Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.*, **51** : 207-216.
- Ordonnance de l'état fédéral Helvète, 2000 Liste des concentrations maximales (valeurs de tolérance, valeurs limites) pour les toxines microbiennes. In : Ordonnance n°817.021.23 sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires. (Ordonnance sur les

substances étrangères et les composants, OSEC) du 26 juin 1995 (Etat le 22 février 2000). Recueil systématique du droit fédéral, Bern, Section 817.

Oswald I.P. & Comera C., 1998. Immunotoxicity of mycotoxins. *Revue Méd. Vét.*, **149** : 585-590.

Otteneder H. & Majerus P., 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit. Contam.*, **17** : 793-798.

Ozcelik N., Kosar A. & Soysal D., 2001. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol. Lett.*, **121** : 9-13.

Palli D., Miraglia M., Saieva C., Masala G., Cava E., Colatosti M., Corsi A.M., Russo A. & Brera C., 1999. Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: correlation with individual characteristics and between repeat measurements. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **8** : 265-269.

Park D.L., Njapau H. & Boutrif E., 1999. Minimiser les risques associés aux mycotoxines, à l'aide du concept HACCP. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/8b.

Pascale M. & Visconti A., 2001. Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Mycopathologia*, **152** : 91-95.

Pavlovic M., Plestina R. & Krogh P., 1979. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with Balkan (endemic) nephropathy. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **87** : 243-246.

Pepeljnjak S., Blazevic N., 1982. Contamination with moulds and occurrence of ochratoxin A in smoker meat products from endemic nephropathy region of Yugoslavia. Proceeding in the fifth International IUPAC Symposium Mycotoxins and Phycotoxins. Austrian Chem. Soc., Vienna, Austria, pp. 102-105.

Peraica M., Radic B., Lucic A. & Pavlovic M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bull. World Health Organ.*, **77** : 754-766.

Peraica M., Domijan A.M., Matasin M., Lucic A., Radic B., Delas F., Horvat M., Bosanac I., Balija M. & Grgicevic D., 2001. Variations of ochratoxin A concentration in the blood of healthy populations in some Croatian cities. *Arch. Toxicol.*, **75** : 410-414.

Petkova-Bocharova T. & Castegnaro M., 1991. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. In : Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., N° 115, pp. 135-137.

Petkova-Bocharova T., Stoichev I.I., Chernozemsky I.N., Castegnaro M. & Pfohl-Leszkowicz A., 1998. Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother. *Environ. Mol. Mutagen.*, **32** : 155-162.

Petzinger E. & Ziegler K., 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **23** : 91-98.

Pfohl-Leszkowicz A., Chakor K., Creppy E.E. & Dirheimer G., 1991. DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In : *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, Eds Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H. IARC Lyon Ed., N° 115, pp. 245-253.

Pfohl-Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E.E. & Dirheimer G., 1993. Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat. Res.*, **289** : 265-273.

Pfohl-Leszkowicz A., 1999a. La patuline. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 279-294.

Pfohl-Leszkowicz A., 1999b. La zéaralénone. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 331-352.

Pfohl-Leszkowicz A., 1999c. Définition et origines des mycotoxines. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 3-15.

Pfohl-Leszkowicz A. & Castegnaro M., 1999a. Les fumonisines. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 295-330.

Pfohl-Leszkowicz A. & Castegnaro M., 1999b. L'ochratoxine A. In : *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 249-277.

Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L. & Piva G., 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Addit. Contam.*, **18** : 647-654.

Pittet A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an update review. *Revue méd. Vét.*, **149** : 479-492.

Pittet A. & Royer D., 2002. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 microg/kg. *J. Agric. Food Chem.*, **50** : 243-247.

Pitout M.J., 1968. The effect of ochratoxin A on glycogen storage in the rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **13**: 299-306.

Pohland A.E., Schuller, P.L., Steyn, P.S. & Van Egmond, H.P., 1982. Physicochemical data for some selected mycotoxins. *Pure Appl. Chem.*, **54** : 2219-2284.

Puntaric D., Bosnir J., Smit Z., Skes I. & Baklaic Z., 2001. Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy. *Croat. Med. J.*, **42** : 175-180.

Ribelin W.E., Fukushima K. & Still P.E., 1978. The toxicity of ochratoxin to ruminants. *Can. J. Comp. Med.*, **42** : 127-136.

Roberts J.C. & Woollven P., 1970. Studies in mycological chemistry. XXIV. Synthesis of ochratoxin A, a metabolite of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J. Chem. Soc.*, **2** : 278-281.

Romani S., Sacchetti G., Chaves Lopez C., Pinnavaia G.G. & Dalla Rosa M., 2000. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *J. Agric. Food Chem.*, **48** : 3616-3619.

Sage L., Krivobok S., Delbos E., Seigle-Murandi F. & Creppy E.E., 2002. Fungal Flora and Ochratoxin A Production in Grapes and Musts from France. *J. Agric. Food Chem.*, **50** : 1306-1311.

Sauvant C., Silbernagl S. & Gekle M., 1998. Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287** : 13-20.

Schramek H., Wilflingseder D., Pollack V., Freudinger R., Mildenerger S. & Gekle M., 1997. Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283** : 1460-1468.

Scheuer R. & Leistner L., 1986. Occurrence of ochratoxin A in pork and pork products. Proceedings of the 32nd European Meeting of Meat Research Workers Vol. I, Madrid, European Meat Research Workers Ghent, Belgium, 191.

Schuh M. & Schweighardt H., 1981. Ochratoxin A : Ein nephrotoxisch wirkendes Mycotoxin. *Übers. Tierernähr.*, **9** : 33-70.

Scott de B., 1965 Toxigenic fungi isolated from cereal and legumes products. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **25** : 213.

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

Scott P.M., 1998. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue méd. Vét.*, **149**, 543-548.

Scudamore K.A., Patel S. & Breeze V., 1999. Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **16** : 281-290.

Searcy J.W., Davis N.D. & Diener U.L., 1969. Biosynthesis of ochratoxin A. *Appl. Microbiol.*, **18** : 622-627

Sedmikova M., Reisnerova H., Dufkova Z., Barta I. & Jilek F., 2001. Potential hazard of simultaneous occurrence of aflatoxin B₁ and ochratoxin A. *Vet. Med.*, **46** : 169-174.

Semple R.L., Frio A.S., Hicks P.A. & Lozare J.V. Mycotoxin prevention and control in foodgrains. Doc. Internet : <http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0036e/X0036E00.htm>

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

Sibanda L., De Saeger S., Bauters T.G., Nelis H.J. & Van Peteghem C., 2001. Development of a flow-through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for ochratoxin A with confirmation by high-performance liquid chromatography. *J. Food Prot.*, **64** : 1597-1602.

Skaug M.A., 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **16** : 75-78.

Skaug M.A., Helland I., Solvoll K. & Saugstad O.D., 2001. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Addit. Contam.*, **18** : 321-327.

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

Sokolsky C., 2002. Cafés solubles, l'arôme en moins. *Que Choisir* ; **389**, 26-30.

Steele J.A., Davis N.D. & Diener U.L., 1973. Effect of zinc, copper, and iron on ochratoxin A production. *Appl. Microbiol.*, **25** : 847-849

Stefanovic V., 1998. Balkan endemic nephropathy: a need for novel aetiological approaches. *Q. J. Med.*, **91** : 457-463.

Stefanovic V. & Polenakovic M.H., 1991. Balkan nephropathy: kidney disease beyond the Balkans? *Am. J. Nephrol.*, **11** : 1-11.

Stegen G.V.D., Jorissen U., Pittet A., Saccon M., Steiner W., Vincenzi M., Winklet M., Zapp J. & Schlatter C., 1997. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Addit. Contam.*, **14** : 211-216.

Steyn P.S. & Holzapfel C.W., 1967. The synthesis of ochratoxin A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wihl. *Tetrahedron*, **23** : 4449-4461.

Steyn P.S., Holzapfel C.W. & Ferreira N.P., 1970. The biosynthesis of ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochem.*, **9** : 1977-1983.

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

Steyn P.S., 1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Revue méd. Vét.*, **149** : 469-478.

Stoev S.D., Vitanov S., Anguelov G., Petkova-Bocharova T. & Creppy E.E., 2001. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Vet. Res. Commun.*, **25** : 205-223.

Stoev S.D., Daskalov H., Radic B., Domijan A.M. & Peraica M., 2002. Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Vet. Res.*, **33** : 83-93.

Stormer F.C., Storen O., Hansen C.E., Pedersen J.I. & 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.

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

Tapia M.O. & Seawright A.A., 1984. Experimental ochratoxicosis A in pigs. *Aust. Vet. J.*, **61** : 219-222.

Teren J., Varga J., Hamari Z., Rinyu E. & Kevei F., 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, **134** : 171-176.

Thirumala-Devi K., Mayo M.A., Reddy G., Emmanuel K.E., Larondelle Y. & Reddy D.V., 2001. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Addit. Contam.*, **18** : 830-835.

Tong C.H. & Draughon F.A., 1985. Inhibition by antimicrobial food additives of ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49** : 1407-1411.

Trucksess M.W., Giler J., Young K., White K.D. & Page S., 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee. *J. AOAC Int.*, **82** : 85-89.

Ueno Y. & Kubota K., 1976. DNA-attacking ability of carcinogenic mycotoxins in recombination-deficient mutant cells of *Bacillus subtilis*. *Cancer Res.*, **36** : 445-451.

Umeda M., Tsutsui T. & Saito M., 1977. Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann.*, **68** : 619-625.

Urbano G.R., Taniwaki M.H., Leitao M.F. & Vicentini M.C., 2001. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *J. Food Prot.*, **64** : 1226-1230.

Uzelac-Keserovic B., Spasic P., Bojanic N., Dimitrijevic J., Lako B., Lepsanovic Z., Kuljic-Kapulica N., Vasic D. & Apostolov K., 1999. Isolation of a coronavirus from kidney biopsies of endemic Balkan nephropathy patients. *Nephron*, **81** : 141-145

Van der Merwe K.J., Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B. & Theron J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, **205** : 1112-1113.

Van der Stegen G.H., Essens P.J. & Van der Lijn J., 2001. Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin a in coffee. *J. Agric. Food Chem.*, **49** : 4713-4715.

Varga J., Kevei E., Rinyu E., Teren J. & Kozakiewicz Z., 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** : 4461-4464.

Verger P., Volatier J.-L. & Dufour A., 1999. Estimation des niveaux théoriques d'ingestion d'aflatoxines et d'ochratoxine. In : Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 371-384.

Visconti A., Pascale M. & Centonze G., 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **864** : 89-101.

Visconti A., Pascale M. & Centonze G., 2000. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **888** : 321-326.

Visconti A., 2000. Mycotoxicology Newsletter Doc. Internet : http://www.mycotoxicology.org/2000_edition/reg-italy.html

Visconti A., Pascale M. & Centonze G., 2001. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **84** : 1818-1827.

Vrabcheva T., Gareis M., Bresch H., Bodechtel C., Engel G., Majerus P., Rosner H. & Wolff J., 1999. Occurrence of ochratoxin A and B in spices and Herbs. *Revue méd. Vét.*, **149** : 533.

Vrabcheva T., Usleber E., Dietrich R. & Martlbauer E., 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J. Agric. Food Chem.*, **48** : 2483-2488.

Walker M. R., 1999. Mycotoxines présentant un intérêt croissant : Ochratoxines. Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines. Tunis, Tunisie, 3-6 mars 1999. MYC-CONF/99/5b.

Wang J.S. & Groopman J.D., 1999. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.*, **424** : 167-181.

Wehner F.C., Thiel P.G., Van Rensburg S.J. & Demasius I.P., 1978. Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutat. Res.*, **58** : 193-203.

Wei X., Sulik K.K., 1993. Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice. *Am. J. Med. Genet.*, **47** : 862-871.

WHO, 1979. Other mycotoxins. In : Environmental health criteria 11 : Mycotoxins. Ed., World Health Organization, Geneva, pp. 86-107.

Xiao H., Marquardt R.R., Abramson D. & Frohlich A.A., 1996. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** : 648-655.

Yamazaki M., Maebayashi Y. & Miyaki K., 1970. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* isolated in Japan from moldy rice. *Appl. Microbiol.*; **20** : 452-454.

Zepnik H., Pahler A., Schauer U. & Dekant W., 2001. Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites ? *Toxicol. Sci.*, **59** : 59-67.

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

Zingerle M., Silbernagl S. & Gekle M., 1997. Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280** : 220-224.

GLOSSAIRE

Adénome

Tumeur bénigne qui se développe sur une glande et qui reproduit sa structure.

Anémie normochrome

Appauvrissement du sang en hémoglobine sans autre changement hématologique.

Caudale

Qui se rapporte à la queue ou à la partie inférieure du corps.

Exencéphalie

Position anormale de l'encéphale qui est placé en arrière du crâne, la paroi supérieure de celui-ci faisant défaut, ainsi que la paroi postérieure du canal vertébral.

Fibrose

Augmentation pathologique du tissu conjonctif contenu dans un organe.

Glomérulonéphrose

Dégénération du glomérule rénal sans inflammation.

Hyalinisation

Transformation d'un tissu pathologique par dégénérescence du collagène.

Ictère

Coloration jaune plus ou moins intense de la peau et des muqueuses par la bilirubine.

Leucopénie

Baisse du nombre des globules blancs. La leucopénie expose à des infections graves par manque de moyens de défense .

Nécrose

Mort d'une cellule ou d'un tissu organique.

Protéinurie

Présence de protéine dans les urine (Normal < 50 mg/24 heures)

Tubulonéphrose

Dégénération du tubule rénal sans inflammation.

Xanthochromie

Différent de l'ictère ; coloration jaune d'or des téguments dû à un pigment sanguin, le lipochrome d'origine alimentaire.

ANNEXE 1

DIRECTIVE 2002/26/CE DE LA COMMISSION
du 13 mars 2002
portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le
contrôle officiel des teneurs en ochratoxine A des denrées alimentaires

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CEE) n° 315/93 du Conseil du 8 février 1993 portant établissement des procédures communautaires relatives aux contaminants dans les denrées alimentaires ⁽¹⁾, et notamment son article 2,

vu la directive 85/591/CEE du Conseil du 20 décembre 1985 concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle des denrées destinées à la consommation humaine ⁽²⁾, et notamment son article 1^{er},

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CE) n° 466/2001 de la Commission du 8 mars 2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires ⁽³⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 472/2002 ⁽⁴⁾, établit les limites maximales applicables à l'ochratoxine A dans certaines denrées alimentaires.
- (2) La directive 93/99/CEE du Conseil du 29 octobre 1993 relative à des mesures additionnelles concernant le contrôle officiel des denrées alimentaires ⁽⁵⁾ introduit un système de normes de qualité pour les laboratoires chargés par les États membres du contrôle officiel des denrées alimentaires.
- (3) Le prélèvement d'échantillons joue un rôle très important dans la fidélité de la détermination des teneurs en ochratoxine A, dont la répartition dans les lots est très hétérogène.
- (4) Il semble nécessaire de fixer des critères généraux auxquels les méthodes d'analyse doivent satisfaire, afin de s'assurer que les laboratoires chargés des contrôles utilisent des méthodes d'analyse d'un niveau de performance comparable.
- (5) Les dispositions concernant le mode de prélèvement des échantillons et les méthodes d'analyse sont établies sur la base des connaissances actuelles et pourront être adaptées à l'évolution des connaissances scientifiques et techniques.
- (6) Les mesures prévues par la présente directive sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Les États membres prennent toutes les mesures nécessaires pour que les prélèvements d'échantillons en vue du contrôle officiel des teneurs en ochratoxine A des denrées alimentaires soient effectués conformément aux méthodes décrites à l'annexe I de la présente directive.

Article 2

Les États membres prennent toutes les mesures nécessaires pour que la préparation des échantillons et les méthodes d'analyse utilisées pour le contrôle officiel des teneurs en ochratoxine A des denrées alimentaires soient conformes aux critères décrits à l'annexe II de la présente directive.

Article 3

Les États membres mettent en vigueur, le 28 février 2003 au plus tard, les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer aux dispositions de la présente directive. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

Article 4

La présente directive entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Article 5

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 13 mars 2002.

Par la Commission

David BYRNE

Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO L 37 du 13.2.1993, p. 1.

⁽²⁾ JO L 372 du 31.12.1985, p. 50.

⁽³⁾ JO L 77 du 16.3.2001, p. 1.

⁽⁴⁾ Voir page 18 du présent Journal officiel.

⁽⁵⁾ JO L 290 du 24.11.1993, p. 14.

ANNEXE I

MODES DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES TENEURS EN OCHRATOXINE A DE CERTAINES DENRÉES ALIMENTAIRES**1. Objet et champ d'application**

Les échantillons destinés aux contrôles officiels des teneurs en ochratoxine A des denrées alimentaires sont prélevés conformément aux méthodes décrites ci-après. Les échantillons globaux ainsi obtenus sont considérés comme étant représentatifs des lots. Le respect des limites maximales fixées dans le règlement (CE) n° 466/2001 est établi sur la base des teneurs décelées dans les échantillons de laboratoire.

2. Définitions

Lot:	quantité identifiable d'une denrée alimentaire, livrée en une fois, pour laquelle il est établi par l'agent responsable qu'elle présente des caractéristiques communes, telles que l'origine, la variété, le type d'emballage, l'emballer, l'expéditeur ou le marquage.
Sous-lot:	partie désignée d'un grand lot, afin d'appliquer le mode de prélèvement à cette partie désignée. Chaque sous-lot doit être physiquement séparé et identifiable.
Échantillon élémentaire:	quantité de matière prélevée en un seul point du lot ou du sous-lot.
Échantillon global:	agrégation de tous les échantillons élémentaires prélevés sur le lot ou le sous-lot.

3. Dispositions générales**3.1. Personnel**

Le prélèvement est effectué par une personne mandatée à cet effet, selon les prescriptions en vigueur dans l'État membre.

3.2. Produit à échantillonner

Chaque lot à analyser fait l'objet d'un échantillonnage séparé. Conformément aux dispositions spécifiques de la présente annexe, les grands lots doivent être subdivisés en sous-lots, à échantillonner séparément.

3.3. Précautions à prendre

Au cours de l'échantillonnage et de la préparation des échantillons, des précautions doivent être prises, afin d'éviter toute altération pouvant modifier la teneur en ochratoxine A ou affecter les analyses ou la représentativité de l'échantillon global.

3.4. Échantillons élémentaires

Dans la mesure du possible, les échantillons élémentaires doivent être prélevés en divers points répartis sur l'ensemble du lot ou sous-lot. Tout écart par rapport à cette règle doit être signalé dans le procès-verbal.

3.5. Préparation de l'échantillon global

L'échantillon global est obtenu en assemblant les échantillons élémentaires.

3.6. Échantillons identiques

Des échantillons identiques, destinés à des mesures exécutoires, au commerce (défense) et à des fins d'arbitrage, sont prélevés sur l'échantillon homogénéisé, pour autant que cette procédure n'aille pas à l'encontre de la législation des États membres en matière d'échantillonnage.

3.7. Conditionnement et envoi des échantillons

Chaque échantillon est placé dans un récipient propre, en matériau inerte, offrant une protection adéquate contre les risques de contamination et les dommages pouvant résulter du transport. Toutes les précautions nécessaires sont prises pour éviter toute modification de la composition de l'échantillon pouvant survenir au cours du transport ou du stockage.

3.8. Fermeture et étiquetage des échantillons

Chaque échantillon officiel est scellé sur le lieu de prélèvement et identifié selon les prescriptions en vigueur dans l'État membre.

Pour chaque prélèvement, un procès-verbal d'échantillonnage doit être établi, permettant d'identifier sans ambiguïté le lot échantillonné et reprenant la date et le lieu d'échantillonnage, ainsi que toute information supplémentaire pouvant être utile à l'analyste.

4. Dispositions spécifiques

4.1. Différents types de lots

Les denrées alimentaires peuvent être commercialisées en vrac, dans des conteneurs ou dans des emballages individuels (sacs, emballages de détail, etc.). Le mode d'échantillonnage peut être appliqué aux différentes formes sous lesquelles les produits sont mis sur le marché.

Sans préjudice des dispositions spécifiques prévues aux points 4.3, 4.4 et 4.5 de la présente annexe, la formule suivante peut être utilisée comme guide pour l'échantillonnage des lots commercialisés dans des emballages individuels (sacs, emballages de détail, etc.):

$$\text{Fréquence d'échantillonnage (n)} \quad n = \frac{\text{Poids du lot} \times \text{poids de l'échantillon élémentaire}}{\text{Poids de l'échantillon global} \times \text{poids d'un emballage individuel}}$$

— poids: à exprimer en kg

— fréquence d'échantillonnage: chaque prélèvement est réalisé tous les tantèmes sacs (les chiffres décimaux sont arrondis au nombre entier le plus proche).

4.2. Poids de l'échantillon élémentaire

Le poids de l'échantillon élémentaire est d'environ 100 grammes, à moins qu'il ne soit défini autrement dans la présente annexe. Dans le cas de lots présentés dans des emballages de détail, le poids de l'échantillon élémentaire dépend du poids de l'emballage de détail.

4.3. Résumé général du mode d'échantillonnage pour les céréales et les raisins secs

Tableau 1: Subdivision des lots en sous-lots en fonction du produit et du poids du lot

Produit	Poids du lot (en tonnes)	Poids des sous-lots ou nombre de sous-lots	Nombre d'échantillons élémentaires	Poids de l'échantillon global (en kg)
Céréales et produits céréaliers	≥ 1 500	500 tonnes	100	10
	> 300 et < 1 500	3 sous-lots	100	10
	≥ 50 et ≤ 300	100 tonnes	100	10
	< 50	—	10-100 ⁽¹⁾	1-10
Raisins secs (raisins secs de Corinthe, «raisins secs» et Sultanines)	≥ 15	15-30 tonnes	100	10
	< 15	—	10-100 ⁽²⁾	1-10

⁽¹⁾ Selon le poids du lot — voir tableau 2 de la présente annexe.

⁽²⁾ Selon le poids du lot — voir tableau 3 de la présente annexe.

4.4. Mode de prélèvement des échantillons pour les céréales et les produits céréaliers (lots ≥ 50 tonnes) et les raisins secs (lots ≥ 15 tonnes)

— À condition que les sous-lots puissent être séparés physiquement, chaque lot doit être subdivisé en sous-lots conformément au tableau 1. Étant donné que le poids d'un lot n'est pas toujours un multiple exact du poids des sous-lots, le poids des sous-lots peut dépasser le poids indiqué jusqu'à concurrence de 20 %.

— Chaque sous-lot doit faire l'objet d'un échantillonnage séparé.

— Nombre d'échantillons élémentaires: 100. Dans le cas de lots de céréales inférieurs à 50 tonnes et de lots de raisins secs inférieurs à 15 tonnes, voir point 4.5. Poids de l'échantillon global = 10 kg.

— S'il n'est pas possible d'appliquer le mode de prélèvement décrit ci-dessus en raison des pertes commerciales qu'entraînerait un dommage du lot (par exemple, à cause des formes d'emballage ou des moyens de transport), un autre mode de prélèvement peut être appliqué, à condition qu'il soit aussi représentatif que possible et qu'il soit décrit en détail et bien documenté.

4.5. Dispositions applicables au prélèvement d'échantillons de céréales et de produits céréaliers (lots < 50 tonnes) et de raisins secs (lots < 15 tonnes)

Pour des lots de céréales inférieurs à 50 tonnes et pour des lots de raisins secs inférieurs à 15 tonnes, le plan d'échantillonnage doit être utilisé avec de 10 à 100 échantillons élémentaires, suivant le poids du lot, formant un échantillon global de 1 à 10 kg.

Les chiffres du tableau suivant peuvent être utilisés pour déterminer le nombre d'échantillons élémentaires à prélever.

Tableau 2: Nombre d'échantillons élémentaires à prélever en fonction du poids du lot de céréales

Poids du lot (en tonnes)	Nombre d'échantillons élémentaires
≤ 1	10
$> 1 - \leq 3$	20
$> 3 - \leq 10$	40
$> 10 - \leq 20$	60
$> 20 - \leq 50$	100

Tableau 3: Nombre d'échantillons élémentaires à prélever en fonction du poids du lot de raisins secs

Poids du lot (en tonnes)	Nombre d'échantillons élémentaires
$\leq 0,1$	10
$> 0,1 - \leq 0,2$	15
$> 0,2 - \leq 0,5$	20
$> 0,5 - \leq 1,0$	30
$> 1,0 - \leq 2,0$	40
$> 2,0 - \leq 5,0$	60
$> 5,0 - \leq 10,0$	80
$> 10,0 - \leq 15,0$	100

4.6. Échantillonnage au stade du commerce de détail

Le prélèvement d'échantillons de denrées au stade du commerce de détail devrait avoir lieu, autant que possible, selon les dispositions qui précèdent. Lorsque ce n'est pas possible, d'autres modes efficaces de prélèvement au stade du commerce de détail peuvent être utilisés, à condition qu'ils garantissent une représentativité suffisante du lot échantillonné.

5. Acceptation d'un lot ou d'un sous-lot

- Acceptation si l'échantillon global est conforme à la limite maximale.
- Refus si l'échantillon global dépasse la limite maximale.

ANNEXE II

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET CRITÈRES APPLICABLES AUX MÉTHODES D'ANALYSE POUR LE CONTRÔLE OFFICIEL DES TENEURS EN OCHRATOXINE A DE CERTAINES DENRÉES ALIMENTAIRES

1. Précautions

L'ochratoxine A étant distribuée de façon hétérogène, les échantillons doivent être préparés (et surtout homogénéisés) avec le plus grand soin.

La totalité du produit reçu dans le laboratoire doit être utilisée pour la préparation du produit à tester.

2. Traitement de l'échantillon reçu dans le laboratoire

L'échantillon global complet est broyé finement et soigneusement mélangé selon une méthode garantissant une homogénéisation complète.

3. Subdivision des échantillons pour des mesures exécutoires et des actions de défense

Les échantillons d'analyse destinés à des mesures exécutoires, au commerce (défense) ou à des fins d'arbitrage sont prélevés sur les échantillons de laboratoire homogénéisés, pour autant que cette procédure n'aille pas à l'encontre de la législation des États membres en matière d'échantillonnage.

4. Méthode d'analyse à utiliser par le laboratoire et modalités de contrôle du laboratoire

4.1. Définitions

Un certain nombre des définitions les plus courantes que les laboratoires seront invités à utiliser sont indiquées ci-après:

Les paramètres de fidélité les plus couramment cités sont la répétabilité et la reproductibilité.

r = répétabilité: valeur en dessous de laquelle on peut s'attendre à ce que la différence absolue entre les résultats de deux tests individuels, obtenus dans des conditions de répétabilité (c'est-à-dire même échantillon, même opérateur, même appareillage, même laboratoire et court intervalle de temps), se situe dans une limite donnée de probabilité (en principe 95 %); d'où $r = 2,8 \times s_r$.

s_r = écart-type, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de répétabilité.

RSD_r = écart-type relatif, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de répétabilité $[(s_r/\bar{x}) \times 100]$, où \bar{x} représente la moyenne des résultats pour tous les laboratoires et échantillons.

R = reproductibilité: valeur en dessous de laquelle on peut s'attendre à ce que la différence absolue entre les résultats de tests individuels, obtenus dans des conditions de reproductibilité (c'est-à-dire pour un produit identique, obtenu par les opérateurs dans différents laboratoires utilisant la méthode de test normalisée), se situe dans une certaine limite de probabilité (en principe 95 %); d'où $R = 2,8 \times s_R$.

s_R = écart-type, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité.

RSD_R = écart-type relatif, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité $[(s_R/\bar{x}) \times 100]$.

4.2. Exigences générales

Les méthodes d'analyse utilisées pour le contrôle des denrées alimentaires doivent satisfaire aux dispositions des points 1 et 2 de l'annexe de la directive 85/591/CEE concernant l'introduction de modes de prélèvement d'échantillons et de méthodes d'analyse communautaires pour le contrôle des denrées destinées à l'alimentation humaine.

4.3. Exigences spécifiques

Pour autant qu'aucune méthode spécifique ne soit prescrite au niveau communautaire pour la détermination des teneurs en ochratoxine A dans les denrées alimentaires, les laboratoires sont libres d'appliquer la méthode de leur choix, à condition qu'elle respecte les critères suivants:

Caractéristiques de performance pour l'ochratoxine A

Teneur µg/kg	Ochratoxine A		
	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Récupération (%)
< 1	≤ 40	≤ 60	50 à 120
1-10	≤ 20	≤ 30	70 à 110

— Les limites de détection des méthodes utilisées ne sont pas indiquées, étant donné que les valeurs relatives à la fidélité sont données pour les concentrations présentant un intérêt.

— Les valeurs relatives à la fidélité sont calculées à partir de l'équation d'Horwitz:

$$RSD_R = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

où:

— RSD_R représente l'écart type relatif, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité $[(s_R/\bar{x}) \times 100]$,

— C est le taux de concentration (c'est-à-dire 1 = 100 g/100 g, 0,001 = 1 000 mg/kg).

Il s'agit là d'une équation générale relative à la fidélité qui a été jugée indépendante de l'analyte et de la matrice et dépendante uniquement de la concentration pour la plupart des méthodes d'analyse de routine.

4.4. Calcul du taux de récupération

Le résultat analytique est enregistré sous forme corrigée ou non au titre de la récupération. La façon d'enregistrer et le taux de récupération doivent être rapportés.

4.5. Normes de qualité applicables aux laboratoires

Les laboratoires doivent se conformer aux dispositions de la directive 93/99/CEE relative à des mesures additionnelles concernant le contrôle officiel des denrées alimentaires.

ANNEXE 2

RÈGLEMENT (CE) N° 472/2002 DE LA COMMISSION
du 12 mars 2002

**modifiant le règlement (CE) n° 466/2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains
contaminants dans les denrées alimentaires**

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu le règlement (CEE) n° 315/93 du Conseil du 8 février 1993 portant établissement des procédures communautaires relatives aux contaminants dans les denrées alimentaires ⁽¹⁾, et notamment son article 2, paragraphe 3,

après consultation du comité scientifique de l'alimentation humaine,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (CEE) n° 315/93 prévoit que des teneurs maximales doivent être fixées pour des contaminants dans les denrées alimentaires afin de protéger la santé publique.
- (2) Le règlement (CE) n° 466/2001 de la Commission ⁽²⁾, modifié en dernier lieu par le règlement (CE) n° 257/2002 ⁽³⁾, fixe des teneurs maximales, applicables à compter du 5 avril 2002, pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.
- (3) Certains États membres ont adopté ou envisagent d'adopter des teneurs maximales pour les aflatoxines contenues dans les épices et pour l'ochratoxine A contenue dans certaines denrées alimentaires. Compte tenu des disparités existant entre les États membres et des distorsions de concurrence qui peuvent en résulter, des mesures communautaires s'imposent pour garantir l'unicité du marché tout en respectant le principe de proportionnalité.
- (4) Les aflatoxines, notamment l'aflatoxine B1, sont des substances cancérigènes génotoxiques. Pour ce type de substances, il n'existe aucun seuil en dessous duquel aucun effet néfaste n'est observé. Il n'est donc pas possible de fixer une dose journalière tolérable. En l'état actuel des connaissances scientifiques et techniques ainsi que des améliorations des modes de production et de stockage, il n'est pas possible d'éliminer complètement le développement de ces moisissures et, en conséquence, la présence des aflatoxines dans les épices. Il y a donc lieu de fixer des limites au niveau le plus faible qu'il soit raisonnablement possible d'atteindre.
- (5) Depuis la fixation des teneurs maximales pour les aflatoxines dans d'autres denrées alimentaires, les résultats d'un programme coordonné de contrôle mis en œuvre par les États membres conformément à la recommandation 97/77/CE de la Commission du 8 janvier 1997 concernant un programme coordonné pour le contrôle officiel des denrées alimentaires pour 1997 ⁽⁴⁾ sont

communiqués. Ces résultats montrent que plusieurs catégories d'épices contiennent une teneur élevée en aflatoxines. Il convient donc de fixer des limites maximales pour les catégories d'épices qui sont utilisées en grandes quantités et qui présentent un degré élevé de contamination.

- (6) Les limites maximales doivent être réexaminées et, le cas échéant, abaissées avant le 31 décembre 2003 en fonction des possibilités de réduire la contamination des épices par les aflatoxines grâce à l'amélioration des conditions de production, de récolte et de stockage ainsi que de l'évolution des connaissances scientifiques et technologiques.
- (7) L'ochratoxine A est une mycotoxine produite par plusieurs champignons (espèces *Penicillium* et *Aspergillus*). Elle est naturellement présente dans de nombreux produits végétaux du monde entier, tels que les céréales, les grains de café, le cacao et les fruits séchés. Elle a été détectée dans des produits tels que les produits à base de céréales, le café, le vin, la bière et le jus de raisin, mais aussi dans des produits d'origine animale, en l'occurrence des rognons de porc. Des enquêtes sur la fréquence et les niveaux de présence de l'ochratoxine A dans des échantillons de denrées alimentaires et de sang humain indiquent que les denrées alimentaires sont souvent contaminées.
- (8) L'ochratoxine A est une mycotoxine ayant des propriétés cancérigènes, néphrotoxiques, tératogènes, immunotoxiques et éventuellement neurotoxiques. Elle a également été associée à la néphropathie chez les humains. L'ochratoxine A peut avoir une longue demi-vie chez les humains.
- (9) Le comité scientifique de l'alimentation humaine a estimé, dans son avis sur l'ochratoxine A du 17 septembre 1998, qu'il serait prudent de réduire autant que possible l'exposition à l'ochratoxine A, en veillant à ce que les expositions se situent près de l'extrémité inférieure de la fourchette de doses journalières tolérables de 1,2 à 14 ng/kg p.c./jour, qui ont été estimées par d'autres organismes, par exemple en dessous de 5 ng/kg p.c./jour.
- (10) En l'état actuel des connaissances scientifiques et techniques et malgré les améliorations apportées aux techniques de production et de stockage, il n'est pas possible d'empêcher complètement le développement de ces moisissures. En conséquence, la présence d'ochratoxine A dans les denrées alimentaires ne peut être totalement éliminée. Il y a donc lieu de fixer des limites au niveau le plus faible qu'il soit raisonnablement possible d'atteindre.

⁽¹⁾ JO L 37 du 13.2.1993, p. 1.

⁽²⁾ JO L 77 du 16.3.2001, p. 1.

⁽³⁾ JO L 41 du 13.2.2002, p. 12.

⁽⁴⁾ JO L 22 du 24.1.1997, p. 27.

- (11) Le principal apport en ochratoxine A dans le cadre de l'ingestion alimentaire provient des céréales et des produits à base de céréales. La prévention est d'une importance essentielle pour éviter autant que possible la contamination et protéger le consommateur. En outre, il convient d'établir des limites maximales pour les céréales et les produits à base de céréales à un niveau raisonnable, pour autant que des actions préventives destinées à éviter la contamination à tous les stades de la chaîne de production et de commercialisation soient entreprises.
- (12) Il a été constaté que les raisins secs (raisins de Corinthe, sultaines et autres raisins secs) présentaient un degré de contamination élevé. Les raisins secs constituent une importante source alimentaire d'ochratoxine A pour les personnes qui en consomment en grandes quantités, notamment les enfants. S'il y a donc lieu, pour le moment, de fixer une limite à un niveau technologiquement réalisable, il est impératif de continuer à améliorer les pratiques visant à réduire la contamination.
- (13) La présence d'ochratoxine A a également été constatée dans le café, le vin, la bière, le jus de raisin, le cacao et les épices. Des enquêtes et des recherches doivent être entreprises par les États membres et les parties intéressées (telles que les associations professionnelles) afin de déterminer les différents facteurs impliqués dans la formation de l'ochratoxine A et de définir les mesures de prévention à prendre en vue de réduire la présence de l'ochratoxine A dans ces denrées alimentaires. Tout doit être mis en œuvre en matière de recherche et de prévention pour réduire autant que possible la teneur en ochratoxine A dans ces produits, en attendant la fixation de limites maximales reposant sur le principe ALARA (niveau le plus faible qu'il soit raisonnablement possible d'atteindre). Si aucun effort n'est accompli en vue de réduire la teneur de certains produits en ochratoxine A, il sera nécessaire d'établir une limite maximale pour ces produits, afin de protéger la santé publique, sans être en mesure d'apprécier la faisabilité technique.
- (14) Le règlement (CE) n° 466/2001 doit donc être modifié en conséquence.
- (15) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

Article premier

Le règlement (CE) n° 466/2001 est modifié comme suit:

- 1) L'article 4, paragraphe 2, est modifié comme suit:
- la phrase introductive est remplacée par la phrase suivante: «En ce qui concerne les aflatoxines et l'ochratoxine A contenues dans des produits mentionnés aux points 2.1 et 2.2 de l'annexe I, il est interdit:»
 - au point b), les mots «et 2.1.3» sont remplacés par «, 2.1.3, 2.1.4, 2.2.1 et 2.2.2».
- 2) À l'article 5, le paragraphe 2 bis suivant est inséré:
- «2 bis. La Commission réexamine, au plus tard le 31 décembre 2003, les teneurs maximales pour les aflatoxines fixées au point 2.1.4 de la section 2 de l'annexe I et, le cas échéant, les abaisse, en vue de tenir compte de l'évolution des connaissances scientifiques et technologiques.
- La Commission réexamine, au plus tard le 31 décembre 2003, les dispositions visées aux points 2.2.2 et 2.2.3 de la section 2 de l'annexe I, en ce qui concerne les teneurs maximales pour l'ochratoxine A dans les raisins secs et en vue d'inclure une limite maximale pour la présence d'ochratoxine A dans le café vert et torréfié et les produits à base de café, le vin, la bière, le jus de raisin, le cacao et les produits à base de cacao et les épices, en tenant compte des enquêtes effectuées et des mesures de prévention adoptées en vue de réduire la présence d'ochratoxine A dans ces produits.
- À cette fin, les États membres et les parties intéressées communiquent chaque année à la Commission les résultats des enquêtes effectuées et les progrès enregistrés en ce qui concerne l'application des mesures de prévention destinées à éviter une contamination par l'ochratoxine A.»
- 3) L'annexe I est modifiée conformément à l'annexe du présent règlement.

Article 2

Le présent règlement entre en vigueur le dixième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Il est applicable à partir du 5 avril 2002.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 12 mars 2002.

Par la Commission

David BYRNE

Membre de la Commission

ANNEXE

Les rubriques suivantes sont ajoutées à la «Section 2 — Mycotoxines» de l'annexe I du règlement (CE) n° 466/2001:

Produit	Teneurs maximales (µg/kg)			Mode de prélèvement d'échantillons	Critères de performance pour les méthodes d'analyse
	B ₁	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	M ₁		
«2.1.4. Catégories suivantes d'épices: — <i>Capsicum</i> spp. (fruits séchés dérivés, entiers ou pulvérisés, y compris les piments rouges, le poivre de Cayenne et la poudre de paprika) — <i>Piper</i> spp. (fruits dérivés, y compris le poivre blanc et le poivre noir) — <i>Myristica fragrans</i> (noix de muscades) — <i>Zingiber officinale</i> (gingembre) — <i>Curcuma longa</i> (safran des Indes)	5	10	—	Directive 98/53/CE	Directive 98/53/CE»

«Produit	Teneurs maximales (µg/kg ou ppb)	Mode de prélèvement d'échantillons	Méthode d'analyse de référence
2.2. OCHRATOXINE A			
2.2.1. Céréales (y compris le riz et le sarrasin) et produits dérivés des céréales			
2.2.1.1. Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin)	5	Directive 2002/27/CE de la Commission (*)	Directive 2002/27/CE
2.2.1.2. Tous les produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation humaine directe)	3	Directive 2002/27/CE	Directive 2002/27/CE
2.2.2. Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10	Directive 2002/27/CE	Directive 2002/27/CE
2.2.3. Café vert et torréfié et produits à base de café, vin, bière, jus de raisin, cacao et produits à base de cacao et épices	—		

(*) JO L 75 du 16.3.2002, p. 44.»

ANNEXE 3

RÉDUCTION DE LA CONTAMINATION DES CÉRÉALES PAR L'OCHRATOXINE A
MÉTHODES RECOMMANDÉES FONDÉES SUR LES BONNES PRATIQUES AGRICOLES (BPA)
ET LES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION (BPF)

AVANT LA RÉCOLTE

1. Se reporter aux paragraphes 4 à 15 du projet de Code d'usages général.
2. Durant la période précédant la récolte, parmi les facteurs qui pourraient influencer sur les niveaux d'ochratoxine A dans les grains récoltés, il faut citer les dégâts causés par le gel, la présence de champignons concurrents, des précipitations excessives et la sécheresse.

RÉCOLTE

3. Se reporter aux paragraphes 16 à 22 du projet de Code d'usages général.

CONSERVATION

4. Il faudrait faire sécher les grains autant que faire se peut avant la récolte en fonction du milieu ambiant et de l'état des cultures. S'il est impossible de récolter les grains lorsque l'activité de l'eau est inférieure à 0,70, les faire sécher jusqu'à ce que leur teneur en eau corresponde à une activité de l'eau de moins de 0,70 (teneur en eau inférieure à 14% dans les petits grains) aussi rapidement que possible. Pour éviter la formation d'ochratoxine A, commencer le séchage immédiatement après la récolte et utiliser à cet effet de préférence de l'air chaud. Dans les régions tempérées, lorsqu'un entreposage intermédiaire ou tampon est nécessaire en raison de la faible capacité de séchage, s'assurer que la teneur en eau est inférieure à 16 %, que la durée du stockage tampon est de moins de 10 jours et que la température est inférieure à 20 °C.

ENTREPOSAGE

5. Se reporter aux paragraphes 23 à 31 du projet de Code d'usages général.

TRANSPORT

6. Se reporter aux paragraphes 32 à 34 du projet de Code d'usages général.

SYSTÈME DE GESTION DE L'OCHRATOXINE A FONDÉ SUR LE SYSTÈME DE L'ANALYSE DES RISQUES – POINTS CRITIQUES POUR LEUR MAÎTRISE (HACCP)

7. Se reporter aux paragraphes 35 à 40 du Code d'usages général.

AVANT-PROJET DE CODE D'USAGES EN MATIERE DE PREVENTION (REDUCTION) DE LA CONTAMINATION DES CEREALES PAR LES MYCOTOXINES

1. Il est impossible à l'heure actuelle d'éliminer totalement les mycotoxines des produits contaminés. L'élaboration et l'acceptation d'un Code d'usages général par le Codex fournira à tous les pays les mêmes conseils à prendre en considération quand ils essaient de contrôler la contamination par diverses mycotoxines. Afin que ce Code d'usages soit utile, les producteurs de chaque pays devront examiner les principes généraux qui y sont énoncés, en tenant compte des cultures, du climat et des pratiques agricoles locaux, avant de tenter d'appliquer les dispositions du Code. Il est important que les producteurs réalisent que les bonnes pratiques agricoles (BPA) représentent la première ligne de défense contre la contamination des céréales par les mycotoxines, suivie par la mise en œuvre de bonnes pratiques de fabrication (BPF) durant la manutention, l'entreposage, la transformation et la distribution des céréales destinées à l'alimentation humaine et animale.
2. Les recommandations pour la réduction des mycotoxines dans les céréales sont divisées en deux parties: les méthodes recommandées fondées sur les Bonnes pratiques agricoles (BPA) et les Bonnes pratiques de fabrication (BPF); un système de gestion complémentaire à examiner dans l'avenir est celui des principes HACCP: Analyse des risques – Points critiques pour leur maîtrise.
3. Ce Code d'usages général contient des principes généraux pour la réduction de diverses mycotoxines dans les céréales qui devraient être sanctionnés par les autorités nationales. Ces dernières devraient apprendre aux producteurs à tenir compte des facteurs environnementaux qui favorisent l'infection, le développement et la production de toxines dans les cultures céréalières sur l'exploitation. Il faudrait mettre l'accent sur le fait que la stratégie à suivre avant ou après la récolte pour une culture particulière dépendra des conditions climatiques de l'année donnée, en tenant compte des cultures locales et des modes de production traditionnels d'un pays ou d'une région donnée. Il est nécessaire de mettre au point des pochettes d'essai rapides, accessibles et précises et des plans d'échantillonnage associés qui permettront de tester des expéditions de céréales sans perturber inutilement les opérations. Des méthodes devraient être mises en place pour manipuler correctement moyennant le reconditionnement, le retrait ou le déroutement des cultures céréalières qui peuvent constituer une menace pour la santé humaine et/ou animale. Les autorités nationales devraient soutenir la recherche sur des méthodes et techniques propres à empêcher la contamination fongique en champ et durant la récolte et l'entreposage.

I. MÉTHODES RECOMMANDÉES FONDÉES SUR LES BONNES PRATIQUES AGRICOLES (BPA) ET LES BONNES PRATIQUES DE FABRICATION (BPF)

AVANT LA RÉCOLTE

4. Envisager la mise en place et le maintien d'un plan de rotation des cultures afin d'éviter de planter le même produit dans un champ durant deux années consécutives. Le blé et le maïs sont particulièrement sensibles à l'espèce *Fusarium* et ne devraient pas être utilisés en rotation l'un après l'autre. Des végétaux comme les pommes de terre, d'autres légumes, le trèfle et la luzerne qui ne sont pas des hôtes de l'espèce *Fusarium* devraient être cultivés en rotation pour réduire l'inoculum en champ.
5. Quand cela est possible et pratique, préparer un lit de semences pour les nouvelles cultures en labourant dessous ou en détruisant ou en enlevant les vieilles têtes à semences, les tiges et autres débris qui pourraient avoir servi ou pourraient servir comme substrats pour le développement de champignons producteurs de mycotoxines. Dans les zones qui sont exposées à l'érosion, des systèmes de culture sans labour peuvent être requis à des fins de conservation des sols.

6. Utiliser les résultats des analyses pédologiques afin de déterminer s'il est nécessaire d'appliquer des fertilisants et/ou des amendements afin d'assurer un pH approprié des sols et une bonne nutrition des plantes, de façon à éviter à ces dernières le stress, notamment pendant la période de développement des semences.
7. Utiliser, quand il en existe, des variétés de semences sélectionnées pour leur résistance aux moisissures et aux insectes parasites. Seules les variétés de semences dont l'emploi est recommandé dans une zone particulière d'un pays devraient être plantées dans cette zone.
8. Dans la mesure du possible, procéder aux semis de façon à éviter les températures élevées et la sécheresse pendant la période correspondant au développement ou à la maturation des semences.
9. Eviter les plantations trop rapprochées en respectant les espacements recommandés entre les rangées et entre les plants pour les espèces ou variétés cultivées. L'information concernant l'espacement peut être fournie par les producteurs de semences.
10. Réduire au minimum les dégâts causés par les insectes et par les infections fongiques au voisinage de la culture, grâce à l'application d'insecticides et de fongicides agréés et à d'autres pratiques appropriées dans le cadre d'un programme de lutte intégrée contre les ravageurs.
11. Lutter contre les mauvaises herbes à l'aide de méthodes mécaniques ou en appliquant des herbicides agréés et grâce à d'autres pratiques sûres et appropriées.
12. Eviter de provoquer des dégâts mécaniques aux plantes pendant le cycle de culture.
13. Si on pratique l'irrigation, s'assurer que l'eau est répartie de façon régulière et que chaque plante en reçoit une quantité suffisante. L'irrigation est une méthode valable pour réduire le stress causé aux plantes dans certaines conditions de croissance. Les précipitations excessives durant l'anthèse (floraison) favorisent la dissémination et l'infection par *Fusarium* spp.; aussi faudrait-il éviter d'irriguer durant l'anthèse et durant le mûrissement des végétaux, en particulier pour le blé, l'avoine, l'orge et le seigle.
14. Procéder à la récolte lorsque la teneur en eau des plantes est faible et qu'elles sont arrivées à pleine maturité, à moins qu'en laissant les cultures parvenir à leur pleine maturité, on risque de leur faire subir des conditions extrêmes de chaleur, de précipitations ou de sécheresse. Retarder la récolte de céréales déjà contaminées par l'espèce *Fusarium* peut causer une augmentation sensible de la teneur en mycotoxines de la culture.
15. Avant la récolte, s'assurer que tout l'équipement qui servira à la récolte et à l'entreposage des cultures, est fonctionnel. Un inconvénient durant cette période critique peut nuire à la qualité des grains et renforcer la formation de mycotoxines. Préparer les pièces de rechange dans l'exploitation de manière à ne pas perdre de temps pour les réparations. Vérifier que l'équipement nécessaire pour mesurer la teneur en eau est disponible et étalonné.

RÉCOLTE

16. Il faut nettoyer les céréales récemment récoltées afin d'enlever les grains endommagés et d'autres matières étrangères. Les grains contaminés mais sans symptôme ne peuvent être enlevés par des méthodes de nettoyage standard. Certains procédés de nettoyage permettent d'éliminer quelques grains contaminés. Il faut tenter de mettre au point des méthodes pratiques pour séparer les grains contaminés mais sans symptôme de ceux qui ne sont pas contaminés.

17. Les conteneurs (par exemple, wagons, camions) à utiliser pour la collecte et le transport des grains récoltés du champ jusqu'aux installations de séchage, et aux installations d'entreposage après le séchage, devraient être propres, secs et non infestés par des insectes, exempts de moisissures visibles avant l'utilisation et la réutilisation.

18. Durant l'opération de récolte, il est nécessaire de vérifier la teneur en eau en divers points de chaque charge de céréales récoltées, étant donné que la teneur en eau peut varier considérablement dans le même champ.

19. Dans la mesure du possible, on évitera de causer des dégâts mécaniques aux grains et le contact avec le sol durant l'opération de récolte. Des mesures seront prises pour minimiser la diffusion des têtes à semences, des balles, des tiges infectées et des débris sur le sol où les spores peuvent inoculer la récolte suivante.

20. Immédiatement après la récolte, déterminer la teneur en eau des céréales; le cas échéant, les faire sécher jusqu'au taux d'humidité recommandé pour l'entreposage. Les échantillons prélevés pour mesurer la teneur en eau devraient être représentatifs du lot autant que possible. Pour réduire la variation de la teneur en eau dans le lot, on peut transférer les céréales jusqu'à une autre installation (ou silo) après le séchage.

21. Il faudrait faire sécher les céréales de manière à réduire les dégâts au minimum et à maintenir des taux d'humidité plus bas que ceux requis pour favoriser la prolifération fongique durant l'entreposage (généralement moins de 15 %). Cela est nécessaire pour empêcher le développement ultérieur d'un certain nombre d'espèces de champignons qui peuvent être présents sur des céréales fraîches, en particulier l'espèce *Fusarium*.

22. Eviter d'empiler ou d'entasser des produits récemment récoltés pendant plus de quelques heures avant le séchage ou le battage, afin d'amoindrir les risques de prolifération fongique. Le séchage au soleil de certains produits dans un milieu très humide peut entraîner une infection par les moisissures. Aérer les denrées par une ventilation forcée.

ENTREPOSAGE

23. Il faut s'assurer que les installations d'entreposage comprennent des structures sèches, bien ventilées qui fournissent une protection contre les pluies, un drainage des eaux souterraines, une protection contre l'entrée des rongeurs et des oiseaux, et des fluctuations minimales de température.

24. Il faut faire sécher les céréales jusqu'à des teneurs en eau sûres et les faire refroidir aussi vite que possible après la récolte. Réduire au minimum la quantité de matières étrangères et de grains endommagés dans les céréales entreposées. Se reporter au paragraphe (cc) pour évaluer l'utilisation de pesticides agrées.

25. Si nécessaire, on surveillera le niveau de mycotoxines dans les céréales lorsqu'elles arrivent à l'entrepôt et lorsqu'elles en sortent, à l'aide de plans d'échantillonnage et d'essai appropriés.

26. Pour les denrées ensachées, s'assurer que les sacs sont propres et secs et les empiler sur des palettes ou intercaler une couche imperméable à l'eau entre les sacs et le sol.

27. Entreposer à une température aussi basse que possible correspondant aux conditions ambiantes, mais éviter les températures proches du point de congélation. Aérer si possible les céréales en faisant circuler de l'air dans la zone d'entreposage pour maintenir une température appropriée et uniforme dans toute cette zone. Contrôler régulièrement la teneur en eau et la température dans les céréales stockées durant l'entreposage.

28. Mesurer régulièrement la température des céréales entreposées. Une hausse de température de 2-3 °C peut indiquer un développement microbien et/ou une infestation par les insectes. Séparer les parties apparemment infectées des céréales et envoyer des échantillons pour l'analyse. Ensuite, abaisser la température des céréales restantes et aérer. Eviter d'utiliser des céréales contaminées pour la production d'aliments destinés à la consommation humaine ou animale.

29. Utiliser de bonnes méthodes d'entretien afin de réduire au minimum la présence d'insectes et la formation de moisissures dans les entrepôts. On utilisera notamment des insecticides et des fongicides agréés appropriés ou d'autres méthodes adaptées. On prendra bien soin de choisir des produits chimiques qui n'influeront pas sur les céréales ni les endommageront, en tenant compte de l'utilisation finale prévue des céréales, et de les utiliser dans les quantités prescrites.

30. L'utilisation d'un agent de conservation agréé et approprié (par exemple des acides organiques tels que l'acide propionique) peut s'avérer utile dans la mesure où ces acides suppriment efficacement les moisissures et préviennent l'apparition de mycotoxines dans les céréales destinées uniquement à l'alimentation animale. Les sels des acides sont habituellement plus efficaces pour l'entreposage à long terme. Il faudra faire preuve de prudence car ces composés peuvent agir négativement sur le goût et l'odeur des céréales.

31. Documenter les méthodes de récolte et d'entreposage appliquées chaque saison en prenant note des mesures (par exemple température, teneur en eau et humidité) et de tout déroutement ou changement par rapport aux pratiques traditionnelles. Ces informations pourraient être très utiles pour expliquer la (les) cause(s) de la formation de moisissures et de mycotoxines durant une campagne particulière et permettraient d'éviter de répéter les mêmes erreurs par la suite.

TRANSPORT

32. Les conteneurs pour le transport devraient être secs et exempts de moisissures visibles, d'insectes et de toute matière contaminée. Selon les besoins, ils devraient être nettoyés et désinfectés avant et après l'emploi et être appropriés à la destination prévue. L'emploi de fumigants et d'herbicides pourrait être utile. Au moment du déchargement, il faudra vider le conteneur de tout son contenu et le nettoyer dans les règles.

33. On protégera les expéditions de céréales de tout surcroît d'humidité en utilisant des conteneurs couverts ou étanches ou des bâches. On évitera les fluctuations de température et les mesures qui pourraient provoquer une condensation à la surface des graines, ce qui pourrait conduire à la formation d'humidité localisée et favoriser l'apparition de moisissures et de mycotoxines.

34. Eviter la pénétration d'insectes, d'oiseaux et de rongeurs durant le transport en utilisant des conteneurs expressément conçus à cet effet et des traitements chimiques à action répulsive s'ils sont approuvés pour l'utilisation finale prévue des céréales.

II. UN SYSTÈME DE GESTION COMPLÉMENTAIRE À ENVISAGER DANS L'AVENIR

35. Le système de l'analyse des risques – Points critiques pour leur maîtrise (HACCP) est un système de gestion de la sécurité sanitaire des aliments qui sert à identifier et à maîtriser les risques durant la production et la transformation. Les principes généraux du système HACCP ont été décrits dans plusieurs documents^{28,29}.

36. Le principe HACCP est un système de gestion intégrée universel. Lorsqu'il est correctement mis en œuvre, ce système devrait déboucher sur une réduction du niveau des mycotoxines dans de nombreuses céréales. L'utilisation des principes HACCP comme système de gestion de la sécurité sanitaire des aliments présente de nombreux avantages par rapport à d'autres types de contrôle de la gestion dans certains secteurs de l'industrie alimentaire. Au niveau de l'exploitation, en particulier en champ, de nombreux facteurs qui influent sur la contamination des céréales par les mycotoxines sont liés à l'environnement, par exemple le temps et les insectes, et il est difficile, voire impossible de les maîtriser. En d'autres termes, les points critiques pour la maîtrise

²⁸ FAO, 1995. Application des principes du système de l'analyse des risques – Points critiques pour leur maîtrise (HACCP) dans le contrôle des produits alimentaires. Étude FAO Alimentation et nutrition n° 58. Rome.

²⁹ ILSI, 1997. A simple guide to understanding and applying the hazard analysis critical control point concept, ILSI Europe Concise Monograph series. 2nd edition, ILSI Europe, Brussels.

souvent n'existent pas en champ. Toutefois, après la récolte, on peut identifier ces points pour détecter les mycotoxines produites par les champignons durant l'entreposage. Par exemple, un point critique pour la maîtrise pourrait être au terme de l'opération de séchage et une limite critique pourrait être la teneur en eau/activité de l'eau.

37. Il est recommandé d'orienter les ressources de manière à ce qu'elles encouragent les Bonnes pratiques agricoles (BPA) avant la récolte et les bonnes pratiques de fabrication (BPF) durant la transformation et la distribution de divers produits. Un système HACCP devrait être fondé sur des BPA et BPF rationnelles.

38. Il est également recommandé de se reporter à l'Appendice du document Codex CAC/RCP 1-1969, Rév.3 (1997) "Système d'analyse des risques – Points critiques pour leur maîtrise (HACCP) et Directives concernant son application", avant d'envisager d'appliquer le système HACCP.

39. Il faudrait également étudier le manuel HACCP pour le contrôle des mycotoxines publié récemment par la FAO/AIEA³⁰.

40. A la troisième Conférence internationale sur les mycotoxines, qui a eu lieu en Tunisie en mars 1999, il a été recommandé en général d'incorporer dans les programmes de lutte intégrée contre les mycotoxines les principes HACCP pour la maîtrise des risques associés à la contamination par les mycotoxines des aliments destinés à la consommation humaine et animale³¹. La mise en œuvre des principes HACCP minimisera la contamination par les mycotoxines moyennant l'application de mesures préventives autant que possible dans la production, la manutention, l'entreposage et la transformation de chaque culture céréalière.

³⁰ HACCP Manuel for Mycotoxin Control. Joint FAO/IAEA Training and Reference Centre for Food and Pesticide Control, *sous presse*.

³¹ FAO. Prévenir la contamination par les mycotoxines. Alimentation, nutrition et agriculture No. 23, 1999. Division alimentation et nutrition, FAO, Rome.



Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



BERTRAND Laurent

Ochratoxine A et aliments : Quel risque pour la santé humaine ?

Thèse de Docteur en Pharmacie, UFR de GRENOBLE.

RESUMÉ

Ce travail consiste en une mise à jour des connaissances d'une mycotoxine (l'ochratoxine A) et de ses conséquences sur la santé humaine. L'ochratoxine A se retrouve dans une multitude d'aliments que nous consommons chaque jour (céréales et dérivées, café, raisins et dérivés, viande de porc...). La répartition géographique de l'ochratoxine A est mondiale et sa production est assurée principalement par des souches d'*Aspergilli* et de *Penicillium*. Les travaux de toxicité sur l'ochratoxine A ont révélé une néphrotoxicité, une immunotoxicité, une tératogénicité, une neurotoxicité et une génotoxicité. Cette dernière fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre le mécanisme exact d'altération de l'ADN et de ses conséquences sur la cellule. L'ochratoxine A a été évoquée comme cause possible de maladie rénale chez l'animal et l'homme (néphropathie endémique des Balkans). Au vue des études de génotoxicité, la réglementation sur les teneurs maximales en ochratoxine A dans les aliments a été renforcée. Les méthodes de prévention tout au long de la chaîne alimentaire se développent et s'affinent afin que le consommateur soit rassuré et protégé de la menace de cette mycotoxine.

MOTS CLÉS : Ochratoxine A – Mycotoxine – Néphrotoxicité – Génotoxicité – Santé Publique.

JURY : Président : Dr Serge KRIVOBOK.
 Membres : Dr Annick VILLET
 Dr Sylviane DRAGACCI

DATE DE LA SOUTENANCE : le 4 Juillet 2002

ADRESSE DE L'AUTEUR : [Données à caractère personnel]

BERTRAND Laurent

Ochratoxine A et aliments : Quel risque pour la santé humaine ?

Thèse de Docteur en Pharmacie, UFR de GRENOBLE.

RESUMÉ

Ce travail consiste en une mise à jour des connaissances d'une mycotoxine (l'ochratoxine A) et de ses conséquences sur la santé humaine.

L'ochratoxine A se retrouve dans une multitude d'aliments que nous consommons chaque jour (céréales et dérivées, café, raisins et dérivés, viande de porc...). La répartition géographique de l'ochratoxine A est mondiale et sa production est assurée principalement par des souches d'*Aspergilli* et de *Penicillium*. Les travaux de toxicité sur l'ochratoxine A ont révélé une néphrotoxicité, une immunotoxicité, une tératogénicité, une neurotoxicité et une génotoxicité. Cette dernière fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre le mécanisme exact d'altération de l'ADN et de ses conséquences sur la cellule. L'ochratoxine A a été évoquée comme cause possible de maladie rénale chez l'animal et l'homme (néphropathie endémique des Balkans). Au vue des études de génotoxicité, la réglementation sur les teneurs maximales en ochratoxine A dans les aliments a été renforcée. Les méthodes de prévention tout au long de la chaîne alimentaire se développent et s'affinent afin que le consommateur soit rassuré et protégé de la menace de cette mycotoxine.

MOTS CLÉS : Ochratoxine A – Mycotoxine – Néphrotoxicité – Génotoxicité – Santé Publique.

JURY : Président : Dr Serge KRIVOBOK.
 Membres : Dr Annick VILLET
 Dr Sylviane DRAGACCI

DATE DE LA SOUTENANCE : le 4 Juillet 2002

ADRESSE DE L'AUTEUR : [Données à caractère personnel]