

DEVENIR DE L'OCHRATOXINE A DANS L'ORGANISME ANIMAL

I. — TRANSPORT SANGUIN DE LA TOXINE CHEZ LE RAT

P. GALTIER

avec la collaboration technique de M. ALVINERIE

Station de Pharmacologie-Toxicologie, I. N. R. A.,
180, chemin de Tournefeuille,
31300 Toulouse

RÉSUMÉ

L'ochratoxine A administrée à raison de 10 mg/kg *per os* chez le Rat mâle adulte est retrouvée à l'état de traces dans les éléments figurés du sang. Par contre, des quantités importantes sont détectées dans le plasma où la concentration maximale est obtenue 8 heures après le traitement (56,7 µg/ml). Par la suite, s'installe une décroissance de la concentration plasmatique dont la loi exponentielle est calculée entre le 6^e et le 10^e jour de l'expérimentation.

Chez ces animaux, la fixation de l'ochratoxine A aux protéines du plasma est de 95 p. 100 ; la saturation du site de liaison intervient pour une teneur de l'ordre de 70 µg/ml. L'ochratoxine A est fixée à l'albumine plasmatique, comme de nombreux acides faibles. Il est discuté des conséquences possibles de cette interaction.

INTRODUCTION

Les études toxicologiques réalisées par administration unique, puis répétée d'ochratoxine A chez le Rat adulte ont suggéré, puis montré la persistance de ce toxique chez l'animal (GALTIER *et al.*, 1974, 1975). Dès lors, une étude sur le transit de cette mycotoxine était nécessaire afin d'en préciser les sites d'accumulation.

Dans ce domaine, CHU (1972) relate l'interaction *in vitro* de l'albumine bovine sérique et de l'ochratoxine A ; NEL et PURCHASE (1968) constatent la présence de mycotoxine dans le foie, le rein et le sang total de rats recevant 5 mg/kg de toxine par voie intrapéritonéale.

Nous avons entrepris l'étude du transport sanguin de l'ochratoxine A, chez le Rat, au cours du temps, après traitement par voie orale. Un article complémentaire sera consacré à la distribution tissulaire et à l'élimination d'ochratoxine A chez le Rat, dans les mêmes conditions expérimentales.

I. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

I. 1. — Animaux

Nous utilisons des rats *Wistar* mâles, adultes, provenant de l'élevage du laboratoire, pesant environ 250 g ; les animaux sont installés individuellement en cage à métabolisme dans un local où règne une température de l'ordre de 21°C.

I. 2. — Administration et prélèvements

Tous les animaux reçoivent par tubage œsophagien, à 9 h du matin, 10 mg d'ochratoxine A par kg de poids vif. On administre un volume de 0,75 ml par rat de 250 g, soit 3,33 mg de toxine par ml de solution isotonique de bicarbonate de sodium (14 g/l).

Les rats sont sacrifiés à différents temps après le traitement : 1, 4, 8, 24, 48, 96, 144, 192 et 240 heures, à raison de 6 rats par temps de prélèvement. Après anesthésie à l'éther et ponction de l'aorte abdominale, on recueille 5 ml de sang sur mélange de Winthrope, puis on centrifuge pour séparer le plasma des éléments figurés.

I. 3. — Méthodes analytiques

I. 3.1. Localisation de l'ochratoxine A dans le sang.

— Éléments figurés : les culots de centrifugation obtenus à partir de sang prélevé 8 et 48 heures après le traitement sont lavés cinq fois au sérum physiologique. On provoque l'hémolyse par addition d'eau distillée. L'ochratoxine A est ensuite extraite par broyage pendant 1 minute au Polytron G.M.B.H. (15 000 tr/mn⁻¹) avec 10 ml d'éther, en ayant pris le soin préalable de ramener la phase aqueuse à pH 2 où la toxine sous forme non ionisée devient liposoluble. Après centrifugation du broyat à 4°C pendant 10 minutes à 10 000 tr/mn⁻¹, on sépare la phase étherée contenant l'ochratoxine A ; après évaporation à sec, cette phase est reprise par du chloroforme. Un dépôt de 10 µl d'extrait sur une plaque chromatographique de gel de silice (MERCK, réf. 5721) développée dans le système toluène-acétate d'éthyle-acide formique (5 : 4 : 1, v/v/v) permet d'estimer visuellement la quantité de toxine par comparaison avec une gamme étalon (seuil de détection : 20 ng).

L'identité de la toxine est confirmée par élution dans deux autres systèmes : chloroforme-acétone-acide formique (80 : 20 : 1, v/v/v) et chloroforme-acétone (60 : 40, v/v) et comparaison des Rf avec celui d'un étalon standard.

— Plasma : 1 ml de chaque plasma est extrait par deux passages au Polytron (cf. éléments figurés), ce qui permet d'obtenir un extrait étheré que l'on évapore et que l'on reprend par une quantité aliquote de sérum physiologique (solution de Tyrode). À l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 1800 équipé en vue de l'analyse de la fluorescence (accessoire SP 860), on établit la courbe d'étalonnage entre l'intensité de fluorescence et la concentration en toxine, cette courbe permet de déduire ensuite la teneur en ochratoxine A des extraits provenant de plasma.

À partir de ces résultats, nous avons établi l'équation de la droite de régression du logarithme de la concentration plasmatique en fonction du temps et nous avons testé le degré de liaison et la linéarité de cette régression.

I. 3.2. Fixation aux protéines du plasma.

— Détermination du pourcentage de liaison : 1 ml de plasma provenant de rats sacrifiés après 8 ou 48 heures est dialysé à 37°C contre 50 ml de solution de Tyrode de même pH (7,4) et de même osmolarité (350 mosm l⁻¹) que le plasma. La dialyse nécessite 24 h pour être complète, aussi doit-on ajouter une goutte de solution de merthiolate de sodium (10 mg ml⁻¹) pour inhiber le développement bactérien. En fin de dialyse, on mesure le volume de dialysat (Vd), le volume de

plasma à dialyser contenu dans le sac (V_s) puis, par fluorimétrie (cf. § I. 3.1.) on détermine la concentration en ochratoxine A contenue dans le dialysat (forme libre). Connaissant la quantité totale de toxine (Q) correspondant pour 1 ml à la concentration plasmatique en ochratoxine A déjà déterminée (cf. § I. 3.1.), on peut calculer le pourcentage de forme liée à condition de prendre en compte le pourcentage de toxine fixée sur le sac de dialyse (p) :

$$p. 100 \text{ de forme liée} = 100 - \frac{100 \text{ Cd } (V_s + V_d)}{Q \left(\frac{100 - p}{100} \right)}$$

Parallèlement, nous avons effectué des essais de dialyse de plasma de rats non traités auxquels sont ajoutés *in vitro* 30, 50, 60, 100, 150, 300 et 450 μg d'ochratoxine A par ml de plasma.

— *Détermination de la protéine responsable du transport* : à partir du sérum de Rat traité depuis 8 heures, on pratique une électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose (Sepraphore III Gelman), dans une cuve Shandon U-77 sous une tension de 255 volts. Le tampon utilisé est un mélange de véronal sodique (8,24 g) et d'eau distillée (QSP 100 ml) dont on assure la parfaite conservation avec 2 gouttes de merthiolate de sodium (10 mg ml^{-1}).

Après migration de 1 heure, on repère à la lampe de Wood (376 nm) la fluorescence due à l'ochratoxine A. Il est alors possible de révéler les protéines par une solution à 0,2 p. 100 de Ponceau S dans l'acide trichloracétique à 3 p. 100, puis de situer la protéine responsable du transport par comparaison avec le repère correspondant à la fluorescence. On peut compléter cette identification par mesure densitométrique de la fluorescence et de l'absorption du protéinogramme au moyen d'un appareil chromoscan Joyce-Loebl équipé pour la lecture des bandes électrophorétiques.

II. — RÉSULTATS

II. 1. — Localisation dans le sang

II. 1.1. Éléments figurés.

Les culots globulaires provenant de 5 ml de sang de rats prélevé 8 ou 48 heures après l'administration du toxique ne contiennent que des traces d'ochratoxine A de l'ordre de 0,1 à 0,3 μg .

II. 1.2. Plasma.

Le plasma, par contre, contient des concentrations de toxines quantifiables quel que soit le moment d'observation. La cinétique plasmatique de l'ochratoxine A est représentée en coordonnées semi-logarithmiques par la figure 1. Nous avons tracé la droite de régression calculée pour les trois derniers temps d'observation (liaison, linéarité significatives) :

$$y = - (0,0048 \pm 0,0009) x + (2,0082 \pm 0,1820)$$

II. 2. — Fixation aux protéines du plasma

II. 2.1. Détermination du pourcentage de liaison.

Le tableau 1 mentionne les pourcentages de fixation obtenus à partir de plasma artificiellement contaminé ou de plasma de rats intoxiqués par l'ochratoxine A, sacrifiés 8 ou 48 heures après l'administration du toxique.

II. 2.2. Détermination de la protéine responsable du transport.

L'ochratoxine A est fixée essentiellement à l'albumine comme en témoigne la figure 2 qui comporte, d'une part les photographies des bandes d'acétate de cellulose

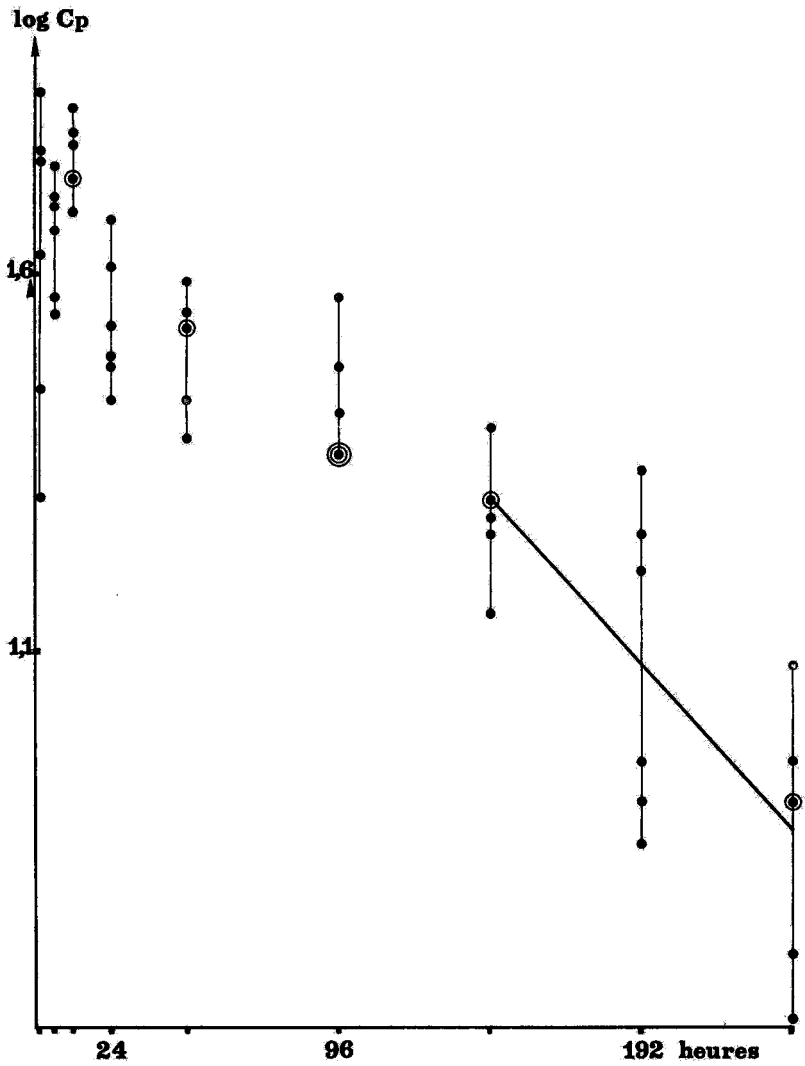


FIG. 1. — Cinétique plasmatique de l'ochratoxine A chez le Rat,
après administration orale de 10 mg/kg de toxine
(Cp = concentration plasmatique d'ochratoxine A)

Plasma kinetic of ochratoxin A following a 10 mg/kg oral administration
(Cp = ochratoxin A plasma concentration)

avant et après coloration des protéines, d'autre part l'enregistrement densitométrique réalisé en fluorescence pour l'ochratoxine A fixée et en transmission pour le protéinogramme correspondant du plasma de Rat.

TABLEAU I

Pourcentages d'ochratoxine A fixée aux protéines plasmatiques

Percentages of ochratoxin A bound to plasma proteins

Plasma artificiellement contaminé		Plasma de rats intoxiqués		
Ochratoxine A ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ plasma)	P. 100 liaison	Traitement appliqué depuis	Ochratoxine A ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ plasma)	P. 100 liaison
30	$95,2 \pm 0,7$	8 heures	56,7	$95,6 \pm 0,4$
50	$94,2 \pm 0,2$	48 heures	32,2	$95,0 \pm 0,5$
60	$93,7 \pm 0,7$			
100	$84,8 \pm 0,9$			
150	$76,2 \pm 0,8$			
300	$60,5 \pm 2,3$			
450	$45,8 \pm 2,1$			

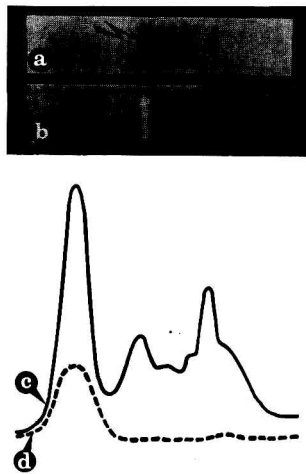


FIG. 2. — *Liaison de l'ochratoxine A avec l'albumine*

- a : Électrophorèse du plasma colorée au Ponceau S.
 b : Fluorescence de l'ochratoxine A liée à l'albumine.
 c : Électrophorégramme enregistré après coloration au Ponceau S.
 d : Fluorodensitométrie de l'électrophorégramme non coloré.

Binding of ochratoxin A with albumin

- a : Plasma electrophoresis stained with Ponceau S.
 b : Fluorescence of ochratoxin A bound with albumin.
 c : Electrophoregram recorded after Ponceau S staining.
 d : Fluorodensitometric assay of non stained electrophoregram.

III. — DISCUSSION

III. 1. — *Localisation dans le sang*III. 1.1. *Éléments figurés.*

La présence de l'ochratoxine A à l'état de traces dans les éléments figurés et en particulier dans les globules rouges permet d'imaginer une fixation importante aux protéines sériques dans la mesure où l'on retrouve cette toxine dans le plasma ; en effet, seule la forme libre peut équilibrer la forme diffusible intracellulaire. Par ailleurs, les protéines intraglobulaires et notamment l'hémoglobine ne semblent pas être en mesure de fixer l'ochratoxine A.

III. 1.2. *Plasma.*

La demi-vie du toxique après administration orale de 10 mg/kg est estimée à 68 heures d'après l'exponentielle calculée à partir des trois derniers temps d'observation (cf. § II. 1.2.) ; ce paramètre traduit la durée de la localisation plasmatique. Comme les concentrations en toxine du plasma sont élevées, l'accumulation constatée en toxicologie (GALTIER *et al.*, 1974), pourrait en partie reposer sur cette longue imprégnation intravasculaire. Toujours à partir de la décroissance exponentielle et dans la mesure où cette loi se conserve dans le temps, on pourrait retrouver le toxique 1 039 heures (43 jours) après l'administration *per os* de 10 mg/kg chez le Rat, en utilisant notre technique fluorimétrique (cf. § I. 3.1.) dont le seuil de détection se situe à $0,01 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de plasma.

La teneur maximale est enregistrée 8 heures après l'administration orale de l'ochratoxine A en raison, semble-t-il, de l'absorption progressive de la toxine. Celle-ci doit se réaliser essentiellement au niveau gastrique puisque l'ochratoxine A est un acide faible de $\text{pKa} = 7,05$ (PITOUT, 1968).

III. 2. — *Fixation aux protéines plasmatiques*III. 2.1. *Pourcentages de liaison.*

Le tableau 1 fait état de l'importance de la fraction liée aux protéines du plasma. Ce résultat était prévisible à plus d'un titre.

Tout d'abord, comme nous en avons déjà discuté, en raison de l'ampleur de la fraction plasmatique comparée aux traces retrouvées dans les éléments figurés.

Ensuite, il convient de rappeler la lenteur de la décroissance de l'ochratoxine A plasmatique (fig. 1) qui, 10 jours après l'administration orale de 10 mg/kg, reste encore de $6,83 \mu\text{g}$ de toxine par ml de plasma. Cette rémanence semble résulter du retard apporté à l'épuration rénale du toxique en raison de la solidité du complexe non diffusible (protéine-ochratoxine A).

La détermination des pourcentages de fixation à partir de sérums artificiellement contaminés (tabl. 1) permet de penser que la saturation du site de liaison intervient pour une concentration voisine de $70 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de plasma ; en effet, des teneurs supérieures provoquent l'apparition d'une forme libre de plus en plus importante. Comme l'administration de 10 mg/kg détermine une concentration plasmatique

maximale de l'ordre de $57 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, on a tout lieu de penser que l'administration d'une dose minima mortelle ($22,67 \text{ mg/kg}$ d'après GALTIER *et al.*, 1975) entraîne une concentration plasmatique supérieure à $70 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ et, partant, un pourcentage de forme libre anormalement élevé qui peut être à l'origine de l'action létale de cette dose.

III. 2.2. *Protéine responsable du transport.*

L'observation de la liaison entre l'ochratoxine A et l'albumine rejoint l'étude de CHU (1970) relative à l'interaction ochratoxine A-albumine sérique bovine, au cours de laquelle cet auteur a déterminé les constantes d'association du complexe à différentes températures.

Dans la structure de l'ochratoxine A, deux aspects jouent vraisemblablement un rôle primordial dans cette interaction. Tout d'abord les fonctions carboxyliques et phénoliques confèrent à la molécule d'ochratoxine A un caractère acide propice à la liaison, comme en témoigne la longue liste des acides faibles pouvant interagir avec l'albumine, par exemple les dérivés salicylés, les sulfonamides, les barbituriques ou la phénylbutazone. D'autre part, le noyau isocoumarinique peut lui aussi être un élément susceptible de former des liaisons de faible énergie avec les protéines du plasma ; en effet, les anticoagulants coumariniques porteurs d'un noyau de configuration voisine sont bien connus pour se lier à l'albumine humaine. Dans ce domaine, il convient de signaler l'article de O'REILLY (1971) décrivant des liaisons de 28,9 à 84,9 p. 100 pour la coumarine, la 4-hydroxycoumarine, l'éthyl-biscoumacétate, l'acénocoumarine, la bishydroxycoumarine, la warfarine ou le phenprocoumon.

III. 2.3. *Conséquences.*

La liaison aux protéines plasmatiques entraîne des conséquences sur la répartition du toxique dans l'organisme et sur sa toxicité.

En ce qui concerne le sort de l'ochratoxine A, la présence d'une importante forme liée de toxine dans le torrent sanguin entraînera des concentrations extracellulaires toujours inférieures aux concentrations plasmatiques. De même, on peut envisager une concentration intracellulaire inférieure à la concentration intravasculaire à moins qu'il n'existe une fixation plus importante encore du toxique sur les protéines intracellulaires.

Deux types d'actions toxiques sont envisageables en raison de la liaison aux protéines. Tout d'abord l'ochratoxine A peut jouer le rôle d'haptène en se fixant sur l'albumine ; le complexe ainsi formé pourrait constituer alors un antigène capable d'engendrer une sensibilisation dont l'hyperplasie des follicules lymphoïdes signalée lors de l'investigation toxicologique (GALTIER *et al.*, 1974, 1975) pourrait être le reflet.

Par ailleurs, la liaison de l'ochratoxine A aux albumines sériques risque d'être rompue après introduction dans l'organisme d'un compétiteur possédant une affinité supérieure vis-à-vis du même site de fixation sur la protéine. On connaît, par exemple, le cas de la phénylbutazone qui déplace les sulfonamides (ANTON, 1959) ou encore les anticoagulants coumariniques dont la libération massive est susceptible d'engendrer des accidents à la suite d'une brusque hypocoagulabilité.

SUMMARY

THE FATE OF OCHRATOXIN A IN THE ANIMAL ORGANISM.

I. — TRANSPORT OF THE TOXIN IN THE BLOOD OF THE RAT

Ochratoxin A given at the rate of 10 mg/kg. by mouth, to the male adult rat is found in traces in the formed elements of the blood. In contrast, considerable amounts are detected in the plasma where the maximal concentration (56.7 $\mu\text{g/ml}$) is obtained 8 hours after administration. A decrease develops afterwards in the plasma concentration of which the exponential law is calculated between the sixth and tenth day of the experiment.

In these animals, binding of ochratoxin A to the plasma proteins is 95 p. 100; saturation of the binding site occurs at about 70 $\mu\text{g/ml}$. Ochratoxin A is bound to the plasma albumin, like many weak acids. The possible consequences of this interaction are discussed.

РЕЗЮМЕ

Развитие охратоксина А в организме животных. — I. Перенос токсина в крови крысы.

Когда подают *per os* 10 мг/кг охратоксина А взрослой крысе мужского пола, следы наблюдаются в элементах крови. Напротив, значительные количества обнаруживаются в плазме, в которой максимальная концентрация достигает 8 через часов 56,7 мкг/мл. Потом, снижается концентрация в плазме. Экспоненциальный закон этого снижения вычисляется между шестым и десятым днём опытов.

У крысы, 95 % охратоксина А фиксируются на белках плазмы; 70 мкг/мл насыщают место связи. Как многие другие слабые кислоты, охратоксин А фиксируется на белке плазмы. Обсуждаются возможные последствия этого взаимодействия.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANTON A. H., 1960. The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy. *J. Pharmacol. exper. Therapeut.*, **129**, 282-290.
- CHU F. S., 1971. Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 359-366.
- GALTIER P., MORE J., BODIN G., 1974. Toxines d'*Aspergillus ochraceus* W. III. Toxicité aiguë de l'ochratoxine A chez le Rat et la Souris adultes. *Ann. Rech. vétér.*, **5** (2), 233-247.
- GALTIER P., BODIN G., MORE J., 1975. Toxines d'*Aspergillus ochraceus* W. IV. Toxicité de l'ochratoxine A par administration orale prolongée chez le Rat. *Ann. Rech. vétér.* (à paraître).
- NEL W., PURCHASE I. F. H., 1968. The fate of ochratoxin A in Rats. *J. S. Afr. chem. Inst.*, **21**, 87-88.
- O'REILLY R. A., 1971. Interaction of several coumarin compounds with human and canine plasma albumin. *Molec., Pharmacol.*, **7** (2), 209-218.
- PITOUT M. J., 1968. The effect of ochratoxin A on the glycogen storage in rat liver. *Toxicol appl. Pharmacol.*, **13**, 299-306.