

TOXICITE A COURT TERME DE L'OCHRATOXINE A CHEZ LE RAT QUELQUES MANIFESTATIONS BIOCHIMIQUES DE L'INTOXICATION

F. HATEY et P. GALTIER

Avec la collaboration technique de :
Claudine EECKHOUTTE et de M. ALVINERIE,

Station de Pharmacologie-Toxicologie INRA, 180, chemin de Tournefeuille, 31300 TOULOUSE

Summary

SHORT TERM TOXICITY OF OCHRATOXIN A : SOME BIOCHEMICAL LESIONS IN THE RAT. — Ochratoxin A, a mycotoxin from *Aspergillus Ochraceus*, is hepatotoxic and nephrotoxic.

The blood serum level of total proteins, urea, total lipids, cholesterol and glucose, and the excretion of nitrogen in the urine were estimated in control or treated rats. Male adult rats were given the toxin *per os* (0, 0.5, 1 or 2 mg/kg) during 10 days. An increase in the urinary volume was observed, with a decrease in the total nitrogen concentration. Blood total proteins and urea levels were higher than in control animals but total lipids and cholesterol levels dropped. Blood glucose concentration remained unaffected. These effects were evident even for the lowest dose and their intensity increased with the amount of toxin given to the animals. Statistical analysis showed significant differences between the results obtained in control animals and those obtained in animals treated with either 2 mg/kg or — except for blood urea — 1 mg/kg.

Introduction

Les travaux réalisés chez le rat intoxiqué par l'ochratoxine A ont montré, à la suite de Theron *et al.* (1966), et de Purchase et Nel (1967) ses effets hépatotoxiques et néphrotoxiques. Par ailleurs, des modifications du stockage et du métabolisme du glycogène ont été mises en évidence par des études histologiques (Purchase et Theron 1968, Munro *et al.*, 1973, 1974) ou biochimiques (Pitout 1968 ; Suzuki et Satoh 1973, 1975) ; l'effet inhibiteur de l'ochratoxine A sur la respiration mitochondriale et la phosphorylation oxydative a été découvert par

Moore et Truelove (1970) et étudié par Meisner et Chan (1974).

En dehors de ces travaux sur le métabolisme glucidique et la production d'énergie, Munro *et al.* (1974) ont réalisé un bilan plus général en dosant dans le sang les électrolytes (Na, K, Ca, Cl), les protéines (protéines totales, albumine, globulines), le glucose, l'urée, la bilirubine, l'activité des phosphatases alcalines et de la transaminase glutamique-oxaloacétique. Parmi ces différents constituants, seule l'urée a présenté une variation significative.

Cependant, il nous est apparu comme peu

probable que les lésions hépatiques et rénales et les manifestations liées à l'intoxication (anorexie, perte de poids, hémorragies) (Galtier et al., 1974, 1975) n'entraînent pas d'autres modifications au niveau sanguin que celle de l'urémie. Nous avons donc exploré de façon globale les différents métabolismes protéique, lipidique et glucidique.

Matériel et méthodes

1. — Animaux et traitement

Quarante rats mâles Wistar (souche Charles Rivers) de même âge (7,5 semaines, poids moyen 250 g) sont répartis en cages de 5 animaux selon un ordre déterminé par un tirage au sort préalable, et placés dans un environnement stable et contrôlé (température $21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, humidité $50 \pm 10\%$; air filtré, renouvelé 12 fois par heure; alternance jour-nuit 14/10). Ils reçoivent de l'eau et des aliments (granulés UAR A 04*) *ad libitum* et sont pesés 3 fois par semaine.

Quinze autres rats mâles analogues aux précédents sont placés dans des cages à métabolisme individuelles après tirage au sort préalable. L'environnement et l'alimentation sont les mêmes que ci-dessus. Après une période d'habituation de 14 jours, et une période témoin de 10 jours au cours de laquelle les animaux ne reçoivent aucun traitement, mais où les urines sont recueillies et la consommation alimentaire relevée, les animaux reçoivent la toxine aux doses de 0, 1 ou 2 mg/kg de poids vif (5 animaux par dose) comme indiqué ci-dessous.

L'ochratoxine A, préparée selon la méthode décrite par ailleurs (Galtier 1974), est mise en solution dans un soluté isotonique de carbonate monosodique (14 g/l) à une concentration de 0,25, 0,50 ou 1 mg/ml. Chaque lot d'animaux, constitué de 10 rats, reçoit tous les jours une dose déterminée de toxine (0, 0,5, 1 ou 2 mg/kg), administrée *per os* à l'aide d'une sonde de gavage. Après la dixième dose, les animaux sont mis à jeun 24 heures (eau *ad libitum*) et sacrifiés.

2. — Prélèvements et analyses

Le sang est prélevé sous anesthésie générale à l'éther éthylique par ponction de l'aorte abdominale. Les analyses sont effectuées le jour même sur le sérum, soit par voie automatique (autoanalyseur Technicon) pour l'urée, le glucose et les protéines tota-

les, soit par voie manuelle pour les lipides et le cholestérol.

Les méthodes utilisées sont les suivantes :

Urée : Colorimétrie après condensation avec la diacétylmonoxime en milieu acétique et en présence de thiosemicarbazide (Marsh et al., 1965).

Glucose : Colorimétrie avec l'ortho-toluidine en milieu acétique (Frings et al., 1970).

Protéines totales : Colorimétrie du complexe coloré formé avec le cuivre en milieu alcalin (Réaction du Biuret), adaptée à l'analyse automatique (Méthodologie Technicon N-14b 1966).

Lipides totaux : Turbidimétrie avec un réactif au sulfate de dextrane après extraction par l'alcool isopropylique (Canal et al., 1972).

Cholestérol total : Colorimétrie en milieu acéto-sulfurique concentré, en présence de perchlorure de fer, selon Assous et Girard (1962).

Les cages à métabolisme permettent le recueil de l'urine dans des éprouvettes graduées, contenant une goutte de Merseptyl (N.D.) en solution à 1‰ et un ml de toluène.

Le dosage de l'azote total urinaire est effectué par minéralisation à chaud en milieu sulfurique concentré (méthode de Kjeldahl) puis dosage de l'ammoniac formé par titrimétrie en retour après entraînement par la vapeur d'eau en milieu alcalin.

L'hématocrite a été déterminé au cours d'expériences préliminaires, après 7 ou 14 jours d'intoxication. Il est obtenu dans des conditions standard après centrifugation du sang total hépariné dans des tubes capillaires.

3. — Traitement des résultats

L'existence d'une différence entre les animaux témoins et traités est testée pour chaque dosage par une analyse de variance à 2 voies et 5 répétitions, permettant la mise en évidence de l'« effet cage », de l'« effet traitement » et d'une éventuelle interaction. Si la différence est significative, les moyennes des lots sont comparées deux à deux selon la méthode de Newman - Keuls. Nous n'avons retenu, au niveau des résultats, que les comparaisons entre les lots témoin et les différents traitements.

Pour les animaux placés en cage à métabolisme, les différents résultats sont regroupés par période, et ils sont rapportés à une unité de 100 g de poids vif et par jour. Nous les exprimerons par le rapport en % de la période du traitement, comparée à la période

* Analyse moyenne en ‰ (valeurs établies par le fabricant) : eau 12; protides 17; lipides 3; glucides 58,7; cellulose 4,3; minéraux 5. Valeur calorifique : 2 900 cal./kg.

Tableau 1 : Effet de l'intoxication sur les concentrations de divers constituants du sérum.
Effect of the intoxication on the concentration of various blood serum constituents.

Traitement	Protéines totales		Urée	Lipides totaux	Cholestérol Total	Glucose
Treatment	Total proteins		Urea	Total lipids	Total cholesterol	
mg/kg	g/l		g/l	g/l	g/l	g/l
0	58,76 ± 0,62	58,26 ± 0,16	0,54 ± 0,03	2,94 ± 0,14	1,59 ± 0,03	1,01 ± 0,05
0,5	60,80 ± 0,32	59,64 ± 0,16	0,52 ± 0,03	2,58 ± 0,10	1,46 ± 0,04	1,07 ± 0,07
				*	**	
1	62,50 ± 1,32	61,58 ± 0,58	0,61 ± 0,03	2,17 ± 0,11	1,33 ± 0,02	1,13 ± 0,07
	**	*		**	**	
2	65,66 ± 1,01	63,38 ± 0,51	0,68 ± 0,03	1,87 ± 0,12	1,31 ± 0,02	1,03 ± 0,05
	**	**	**	**	**	

(moyenne et écart type de la moyenne de chaque lot, et, dans le cas des protéines totales, de chaque cage)

Le degré de signification des différences par rapport aux valeurs témoins, testé selon la méthode de Newman-Keuls, est indiqué comme suit :

* : P < 0,05

** : P < 0,01

Pour la signification globale des résultats, voir aussi l'analyse de variance (tableau 2).

témoin, ramené éventuellement à 100 % pour les animaux recevant 0 mg/kg d'ochratoxine.

Résultats

1. — Evolution des animaux

Les gains de poids au neuvième jour, exprimés en pourcentage par rapport au poids initial ont été les suivants (moyennes par lots) 19,8 %, 15,4 %, 11,2 % et 7,03 % pour des doses respectives de 0, 0,5, 1 ou 2 mg/kg/jour d'ochratoxine.

Dans le cas des animaux placés en cages à métabolisme individuelles, les gains de poids sur l'ensemble de la période du traitement ont été, en pourcentage par rapport à l'ensemble de la période témoin, de 13, 6,6 et 6,3 % pour des doses de toxine de 0, 1 et 2 mg/kg respectivement.

— Pour ces mêmes animaux, la consommation en aliment, exprimée de la même manière a été de 80, 68,3 et 61,5 % respectivement, soit en ramenant à 100 la valeur du groupe témoin 85 et 77 % pour les deux traitements.

— Le volume urinaire est augmenté au cours du traitement, même chez les témoins,

mais de façon moins importante : en pourcentage par rapport à la période témoin : 140,5, 170,8 et 193,7 % pour 0, 1 et 2 mg/kg respectivement, soit en ramenant à 100 la valeur du groupe témoin 121,6 et 137,9 % pour 1 et 2 mg/kg respectivement.

2. — Dosages

La concentration en azote urinaire total a diminué pendant la période de traitement, soit 81, 85 et 58 % pour les trois traitements (0, 1 et 2 mg/kg respectivement) par rapport à la période témoin. L'élimination urinaire azotée (volume x concentration) a donc varié dans les proportions suivantes : 114 % pour le lot témoin, 146 % pour les animaux traités à 1 mg/kg, et 113 % pour ceux recevant 2 mg/kg, soit, par rapport à un témoin de 100 %, 128 et 99,6 %.

Les valeurs de l'hématocrite observées ne sont pas significativement différentes. Pour des doses de 0, 0,5, 1 et 2 mg/kg d'ochratoxine, nous avons obtenu (moyenne ± écart type de la moyenne) respectivement 55,5 ± 1,44, 58,80 ± 2,44, 56,80 ± 0,73, 55,0 ± 1,73 après 7 jours de traitement, et 54,9 ± 1,86, 54,33 ± 2,03, 54,33 ± 2,30 (pas de résultats pour 2 mg/kg) après 14 jours de traitement.

Tableau 2 : Analyse de variance des données du tableau 1.

Constituant étudié <i>Constituent under study</i>	Source de variation. <i>Source of variation</i>		
	Effet Traitement <i>Treatment effect</i>	Effet Cage <i>Cage effect</i>	Interaction
	F 3 32	F 1 32	F 32 3
Protéines totales <i>Total proteins</i>	27,16 ***	6,06 *	0,59
Urée <i>Urea</i>	6,75 **	1,63	2,04
Lipides totaux <i>Total lipids</i>	15,83 ***	0,45	1,07
Cholestérol total <i>Total cholesterol</i>	18,72 ***	0,36	0,23
Glucose	1,28	0,70	0,15

Valeurs de F avec les degrés de liberté correspondants :

*** P < 0,001

** P < 0,01

* P < 0,05

Les valeurs moyennes des 4 lots, obtenues pour chaque dosage, et le degré de signification des différences entre traitements sont regroupées sur le tableau 1. Les modifications observées à la suite de l'intoxication sont les suivantes :

— Une augmentation de taux des protéines totales et de l'urée ;

— Une diminution du taux du cholestérol et des lipides, particulièrement importante pour ces derniers.

La glycémie ne présente pas de variation significative.

Discussion

1. — *Traitement des résultats*

L'analyse de variance (tableau 2) constitue un préalable à l'étude de l'effet des différentes doses ; elle nous permet de vérifier :

a) l'absence d'interaction entre les deux facteurs étudiés, les traitements et les cages, c'est-à-dire en particulier que l'effet du traitement est le même quelle que soit la cage.

b) l'absence pratiquement complète d'un effet cage, c'est-à-dire qu'au sein d'un même traitement, les animaux des deux cages réagissent de la même manière. Une exception toutefois, et pour laquelle nous n'avons aucune explication à proposer, est celle des

protéines totales ; dans ce cas, nous avons été conduits à comparer les moyennes des cages et non plus celles des lots (tableau 1). La comparaison des deux cages d'un même lot a mis en évidence une seule différence significative, pour le traitement à 2 mg/kg.

2. — *Résultats*

Les doses d'ochratoxine utilisées nous ont permis de mettre en évidence différentes modifications biochimiques, sans entraîner la mort des animaux. Il est intéressant de noter que, à l'exception du glucose dont les variations ne sont pas significatives, la toxine est active, même à faible dose où l'on peut s'attendre à un effet réversible ; en outre, les modifications sont d'autant plus marquées que la quantité de toxine administrée est plus importante. Pour essayer d'interpréter ces différentes variations, nous considérons que le taux d'un constituant sanguin quelconque est, à chaque instant la résultante de l'équilibre entre les entrées (apport alimentaire, synthèse, mobilisation des réserves) et les sorties (stockage, catabolisme, élimination). La variation d'une concentration peut donc être interprétée en fonction de ces différentes composantes.

De plus, l'absence de variation du taux de glucose permet d'écartier l'intervention

directe d'un mécanisme endocrinien. (Hormones thyroïdiennes, gluco-corticoïdes).

Métabolisme protéique : Augmentation du taux des protéines et de l'urée.

L'absence de variation de l'hématocrite permet, si le nombre des globules rouges n'est pas modifié, d'écarter l'hypothèse d'une hémococoncentration pour expliquer l'élévation du taux des protéines sanguines.

Cette variation n'a pas été observée par Munro *et al.*, 1974 ; cette différence peut être due soit à la durée de l'intoxication (2 semaines contre 10 jours dans notre expérience), soit à l'utilisation d'animaux plus petits (100 g contre 250 g).

De même, l'augmentation importante — 32 % — du volume urinaire n'a pas été observée par cet auteur qui relève au contraire une diminution. Le protocole expérimental qu'il met en œuvre — transfert des animaux en fin de traitement dans des cages à métabolisme, administration *per os* de 2 ml d'eau et recueil des urines pendant 16 heures — diffère fondamentalement de celui que nous avons adopté, et cela suffit sans doute à rendre compte de la divergence de nos résultats.

Compte tenu de l'anorexie importante et de l'augmentation du catabolisme protéique, mise en évidence par celle de l'urémie — également rapportée par Munro *et al.*, 1974 — et éventuellement celle de l'élimination azotée urinaire, l'élévation du taux des protéines du sang pourrait résulter d'une redistribution des éléments protéiques de l'organisme et contribuer à la perte de poids.

Métabolisme lipidique :

La diminution du taux des lipides totaux peut être due soit à une baisse de l'apport alimentaire liée à l'anorexie, soit à un ralentissement de la synthèse au niveau hépatique lié à l'hépatotoxicité de l'ochratoxine, soit enfin à une augmentation du catabolisme. Le tissu adipeux joue également un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique, mais,

dans nos conditions expérimentales, nous ne possédons aucune information sur son activité.

Des mécanismes analogues (baisse de l'apport alimentaire, diminution de la biosynthèse) peuvent être invoqués pour expliquer la chute du taux du cholestérol.

Avant de sacrifier les animaux, nous les avons soumis à un jeûne de 24 h pour éliminer l'influence de la prise de nourriture sur le taux des différents constituants étudiés. Cependant, une telle période de privation entraîne une mobilisation des lipides et une stéatose hépatique.

Malgré la présence d'un groupe témoin, on ne peut être certain de l'action directe de l'ochratoxine sur le métabolisme lipidique : en effet, cette interprétation suppose que les animaux témoins et traités réagissent de la même manière vis à vis du jeûne. Il serait donc intéressant de comparer les résultats obtenus ici avec ceux d'une expérience où le jeûne serait supprimé, ou bien avec un lot d'animaux non traités, mais dont la consommation alimentaire serait égale à celle des sujets traités.

Conclusion

Le caractère global des dosages que nous avons réalisés ne permet pas de conclure quant au mode d'action de l'ochratoxine A. Cependant, bien que les tests employés soient très généraux, nous avons pu mettre en évidence des modifications importantes du taux des protéines et des lipides, relevant ainsi des perturbations profondes du métabolisme. La mise en œuvre d'une exploration fonctionnelle hépatique permettra de préciser au moins en partie l'impact de l'ochratoxine A et de mieux connaître le mécanisme de sa toxicité.

(Accepté pour publication en juin 1976.)

Résumé

L'ochratoxine A, une mycotoxine produite par *Aspergillus Ochraceus*, entraîne chez le rat des lésions hépatiques et rénales. Nous avons exploré globalement les différents métabolismes protéique, lipidique et glucidique chez des rats intoxiqués *per os* en mesurant dans le sang de ces animaux le taux des protéines totales, de l'urée, des lipides, du cholestérol et du glucose, ainsi que l'élimination azotée urinaire.

Après 10 jours de traitement, nous avons observé une forte augmentation du volume urinaire, accompagnée d'une diminution de la concentration en azote total. Dans le sang, le taux des protéines totales et de l'urée est augmenté, tandis que celui des lipides totaux et

du cholestérol total est fortement diminué ; la glycémie ne présente pas de variation significative.

La toxine est active sur les différentes variables étudiées, même à faible dose, et les effets sont d'autant plus marqués que la quantité administrée est plus importante. L'analyse statistique montre des différences significatives entre les témoins et les animaux traités à 2 mg/kg ou — sauf pour l'urée — à 1 mg/kg.

Références

- ASSOUS E.F., GIRARD M.L., 1962. Microméthode nouvelle de dosage du cholestérol libre et du cholestérol total directement sur le sérum sanguin. — *Ann. Biol. Clin.*, **20**, 973-986.
- CANAL J., DELATTRE J., GIRARD M.L., 1972. Acquisitions nouvelles dans le dosage des lipides totaux du sérum : description d'une méthode néphélométrique. — *Ann. Biol. Clin.*, **30**, 325-332.
- FRINGS C.S., RATLIFF C.R., DUNN R.T., 1970. Automated determination of glucose in plasma and urine by a direct o-toluidine procedure, in *Advances in automated analysis*, Technicon international Congress 1969, vol. I, 73-75, Mediad Incorporated, White Plains, New York.
- GALTIER P., 1974. Toxines d'*Aspergillus Ochraceus* Wilhelm. II. Isolement par chromatographie sur couche mince de l'ochratoxine A obtenue à partir de milieux liquides faiblement concentrés en toxine. — *Ann. Rech. Vét.*, **5**, 155-166.
- GALTIER P., BODIN G., MORE J., 1975. Toxines d'*Aspergillus Ochraceus* Wilhelm. IV. Toxicité de l'ochratoxine A par administration orale prolongée chez le rat. — *Ann. Rech. Vét.*, **6**, 207-218.
- GALTIER P., MORE J., BODIN G., 1974. Toxines d'*Aspergillus Ochraceus* Wilhelm. III. Toxicité aiguë de l'ochratoxine A chez le rat et la souris adulte. — *Ann. Rech. Vét.*, **5**, 233-247.
- MARSH W.H., FINGERHUT B., MILLER H., 1965. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. — *Clin. Chem.* **11**, 624-627.
- MEISNER H., CHAN S., 1974. Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. — *Biochem.*, **13**, 2795-2799.
- MOORE J.H., TRUELOVE B., 1970. Ochratoxin A : Inhibition of mitochondrial respiration, *Science*, **168**, 1102-1103.
- MUNRO I.C., MOODIE C.A., KUIPER-GOODMAN T., SCOTT P.M., GRICE H.C., 1974. Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of Ochratoxin A. — *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **28**, 180-188.
- MUNRO I.C., SCOTT P.M., MOODIE C.A., WILLES R.F., 1973. Ochratoxin A - occurrence and toxicity. — *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **163**, 1269-1273.
- PITOUT M.J., 1968. The effect of ochratoxin A on glycogen storage in the rat liver. — *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **13**, 299-306.
- PURCHASE I.F.H., NEL W., 1967. Advances in research on ochratoxin, in MATELES R.I., WOGAN G.M. — *Biochemistry of some foodborne microbial toxins*, 153-156, MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- PURCHASE I.F.H., THERON J.J., 1968. The acute toxicity of ochratoxin A to rats. — *Food Cosmet. Toxicol.*, **6**, 479-483.
- SUZUKI S., SATOH T., 1973. Effect of ochratoxin A on tissue glycogen levels in rats. — *Japan. J. Pharmacol.*, **23**, 415-419.
- SUZUKI S., SATOH T., YAMAZAKI M., 1975. Effects of ochratoxin A on carbohydrate metabolism in rat liver. — *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **32**, 116-122.
- THERON J.J., VAN DER MERWE K.J., LIEDENBERG N., JOUBERT H.J.B., NEL W., 1966. Acute liver injury in ducklings and rats as a result of ochratoxin poisoning. — *J. Path. Bact.*, **91**, 521-529.